



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA



“Activación de receptores pentaméricos
gatillados por neurotransmisores”

Jeremías Corradi

Bahía Blanca

Argentina

2009



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA

“Activación de receptores pentaméricos
gatillados por neurotransmisores”

Jeremías Corradi

Bahía Blanca

Argentina

2009

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 9 de Noviembre de 2004 y el 24 de Noviembre de 2008, bajo la dirección de Doctora Cecilia Bouzat, Profesor Adjunto de la cátedra de Farmacología II.

Agradecimientos

En primera instancia quisiera agradecer a mi País y la sociedad, que me brindaron la posibilidad de desarrollar mis estudios y capacitación en forma gratuita. Por lo mismo, agradezco al INIBIBB y la Universidad Nacional del Sur, los cuales me dieron el sustento técnico y académico para cumplir mis objetivos.

Agradezco a la Doctora Cecilia Bouzat por haberme abierto las puertas de su grupo y darme la posibilidad de crecer y aprender haciendo, pensando, probando, investigando, rompiendo (a veces), encontrando soluciones, etc. Siempre estaré agradecido por su apoyo y constante aliento, fundamentalmente en los momentos difíciles, tanto académicos como personales; por su ejemplo de dedicación y amor por la ciencia sin olvidar la importancia de la familia y la persona.

A mis queridos viejos, siempre al pie del cañón, con palabras de aliento, sufriendo mis complicaciones con mayor intensidad que si fueran propias, y espero que disfrutando mis logros de la misma manera. Siempre me alentaron a hacer las cosas honestamente y con esfuerzo, y me

impulsaron a hacer aquello que me hiciera feliz, confiando plenamente en mis decisiones. No tengo palabras, ni suficientes páginas, para expresar lo agradecido que estoy para con ellos.

A mi querida petisa, Romi, mi reciente, flamante y adorada esposa. Siempre fue un ejemplo a nivel académico, desde los tiempos de estudio cuando la miraba desde lejos preguntando cosas imposibles a los profesores, y más aún ahora, siendo una increíble doctora en bioquímica con innumerables ideas y proyectos. Sé, fehacientemente, que mi futuro económico está asegurado a su lado. Pero también es un gran ejemplo de humildad y humanidad, por su amor a Dios, a la vida, al prójimo (lo cual incluye, obviamente, perros de todo tipo) y su generosidad absoluta. Gracias por todas las palabras, abrazos y consejos, especialmente en los momentos más difíciles.

Un agradecimiento especial a la personita más dulce, sincera, tierna, adorable, (...)n, mi querida hija Valentina. Siempre con una sonrisa, siempre con un sol en sus dibujos con el que da luz y calor a todos los que la rodean. El amor y el cariño que expresa fueron elementos clave para mantenerme en pie en todo momento.

Obviamente, mi total agradecimiento a Rumi y Raúl, mis queridos e increíbles suegros. Dos personas tan simples y naturales con los cuales siempre encontré una vía de escape en los momentos de agobio y preocupación. Gracias por las comidas, la ropa lavada, las tardes de fútbol y mate, el cuidado de Carola, y todas las cosas que hicieron por mí y mi familia (ahora nuestra familia).

A mis incansables amigos, hermanos de la vida, Fede, Matu, Oyo y Guille. No sé la cantidad de fotos (de las viejas) que tengo con ellos a lo largo de toda mi vida. A pesar de la distancia que nos separó al momento de elegir nuestros caminos, siempre estuvimos conectados, y no solo por Internet.

A mis hermanos Scouts, Baty (G), Baty (C), Lobo, Ciervo, Tero, Ale, Cholo, Castor, Nono, Halcón, Loba, Cóndor, Pantera, Paloma, Memi,

Abeja, Hormiga, y otros animalitos de Dios que además de acompañarme en mi ruta hacia el servicio y la felicidad, me ayudaron a esquivar, e incluso le pusieron el pecho a algunos escoyos que amenazaron mi canoa.

A mis compañeros de laboratorio, quienes me acompañaron en este camino de aprendizaje. Agradezco especialmente a Guille (Doctor Guillermo Federico Spitzmaul), quien me sumó a su trabajo, me enseñó todo lo que estaba a su alcance y me abrió las puertas de su casa brindándome su amistad. A Cármen, Diego, Jo, Fer (G), Fer (T), Mariana, Guillermina, Natalia, y Mati, por aguantarme, apoyarme, alentarme y aconsejarme, conformando juntos, no solo un grupo de trabajo, sino también un grupo de amigos.

Al excelente grupo humano y de trabajo con el que comparto un aspecto sumamente gratificante de mi carrera, la ilustre cátedra de Genética Molecular. Gracias Marina, Sole (Paloma), Anita, Lety, Juan Pablo y Vicky por enseñarme y ayudarme a desarrollarme como docente, por los mates, las risas y los asados compartidos.

Finalmente, quiero agradecer a todo el grupo de personas del INIBIBB, que realizan con compromiso su trabajo, lo cual facilitó enormemente el desarrollo de mi tesis. Gracias Dora, Bea, Horacio, Quilo, Hugo, Mariano, Laura, Guille, Susana, y todo el personal. Quiero especialmente agradecer a Leti, que no solo cumplió con las tareas que la institución exige, sino que también me brindó su sincera amistad, prestando su ayuda en un sinnúmero de cosas que sin ella no hubiera podido solucionar.

24 de Noviembre de 2008

Jeremías Corradi

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mereciendo
la calificación de(.....)

MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE RECEPTORES CYS-LOOP.

Resumen

La comunicación celular es un proceso fundamental para la supervivencia de los organismos. Gracias a las distintas vías de comunicación, las células reciben e interpretan mensajes del exterior, los cuales inducen respuestas necesarias para el correcto funcionamiento de dichas células y del organismo que estas constituyen.

Los canales iónicos activados por ligandos (LGIC) son proteínas integrales de membrana encargadas de transducir la señal proveniente del exterior hacia el interior celular. Sus vías de transducción son muy variadas, pero en general llevan a dos respuestas fundamentales según el receptor implicado, respuesta de excitación o respuesta de inhibición.

Dentro del grupo LGIC existen tres familias de receptores, cada una conformada por varios miembros relacionados evolutivamente. Dichas familias se clasifican como: canales catiónicos activados por glutamato, canales activados por ATP y los receptores pertenecientes a la familia *Cys-loop*.

En el presente trabajo de tesis doctoral estudiamos los mecanismos de activación de dos miembros de la familia de receptores *Cys-loop*, el receptor de acetilcolina de músculo adulto (AChR) y el receptor de serotonina homopentamérico tipo 3A (5-HT_{3A}R). El AChR es considerado el modelo, tanto estructural como funcional, para todos los miembros de esta familia.

Para un mejor entendimiento de los mecanismos que llevan al correcto funcionamiento de dichos receptores, es necesario: a) conocer su estructura molecular y los mecanismos que gobiernan su activación, y b) definir un modelo cinético que logre representar los estados en los cuales se encuentra el receptor y los pasos afectados por mutaciones o moduladores.

En base a estudios de mutagénesis dirigida, determinamos el aporte de los residuos 15' de M1 de las subunidades α , ε y δ para el correcto funcionamiento del AChR. Además, definimos la relación entre el volumen del residuo en dicha posición y el efecto provocado sobre la eficiencia de gatillado del canal. Observamos que para la subunidad α el aumento del volumen del residuo en 15' lleva a una disminución en la constante de gatillado del canal. En cambio, para las otras subunidades, ocurre el efecto opuesto.

Demostramos que los residuos 15' de M1 y 11' de M2 de la subunidad α interactúan directamente. Dicha interacción explicaría la relación observada entre el volumen del residuo en 15' de M1 y la eficiencia del canal, donde la interacción 11'-15' se vuelve más significativa al aumentar el volumen del residuo en 15', llevando a una reducción en la eficiencia del gatillado del canal.

Debido a la baja conductancia del canal del 5-HT_{3A}R, solo han sido propuestos hasta el momento modelos cinéticos basados en el análisis de corrientes macroscópicas. Utilizando el receptor de serotonina de alta conductancia (5-HT_{3A}R-AC) obtuvimos corrientes macroscópicas y registros de canal único. En base a dichos registros, definimos un modelo cinético que describe con alto grado de exactitud los datos experimentales. Este es el primer modelo que, además de representar lo observado a nivel de corrientes macroscópicas, describe también la activación del receptor a nivel de canal único.

Por otro lado, realizamos mutaciones sobre el 5-HT_{3A}R-AC en los residuos 10' y 14' del segmento M4. Dichos residuos fueron demostrados como importantes en el gatillado del AChR y presentan un patrón de conservación particular entre las subunidades de estos dos receptores. Confirmamos que ambos residuos son importantes para el correcto funcionamiento del 5-HT_{3A}R, donde las mutaciones en 10' afectaron la activación del receptor a nivel de canal único y las mutaciones en 14' solo mostraron efectos a nivel de las corrientes macroscópicas.

Utilizando los datos obtenidos a partir del receptor mutado en 10' de M4, realizamos el análisis cinético en base al esquema propuesto. Determinamos que las velocidades afectadas fueron fundamentalmente las

de apertura y cierre del canal, similar a lo demostrado para el residuo equivalente del AChR.

Nuestros resultados brindan importante información sobre la intervención de los segmentos transmembranales en el correcto funcionamiento de receptores de la familia *Cys-loop*. Asimismo, muestran cómo la función de determinados aminoácidos se ha conservado durante la evolución.

Además, definimos el primer modelo cinético para el 5-HT_{3A}R, el cual representa correctamente la activación de este receptor, tanto a nivel de corrientes macroscópicas como de canal único. La utilización de este modelo será de gran apoyo al entendimiento de los efectos generados por mutaciones o la acción de moduladores de la funcionalidad de dicho receptor.

ACTIVATION AT SINGLE-CHANNEL LEVEL OF CYS-LOOP RECEPTORS.

Summary

Cellular communication is a fundamental process for survival of the organisms. Thanks to different signaling pathways, cells can receive messages from the environment which induce responses that allow appropriate functioning of these cells and the organism that they constitute.

Ligand-gated ion channels (LGIC) are integral membrane proteins involve in transduction of signals from the external side of the cell. These signaling pathways are diverse, but in general, they can generate one of both responses: excitatory or inhibitory response.

The LGIC group is composed by three different families of receptors: the glutamate-activated cationic channels, the ATP-gated channels, and the Cys-loop receptors.

In the present thesis we studied the mechanism of activation of two members of the Cys-loop receptor family, the nicotinic acetylcholine receptor (AChR) and the homopentameric serotonin type 3A receptor (5-HT_{3A}R). The AChR has been the structural and functional model of all members of this family.

For a better understanding of the mechanisms that lead to the correct functioning of these receptors is necessary to: a) know its molecular structure and the mechanisms which govern its activation, and b) define a kinetic model that describes its activation and elucidate how mutations or modulators can affect the transitions between different conformational states.

By combining site-directed mutagenesis with electrophysiological studies we determine the contribution of residues at position 15' of M1 in α , ϵ and δ subunits to the correct functioning of the AChR. We also define the relationship between the volume of the residue at this position and efficacy

for channel gating. We show that the increase in the volume of residue at 15' of M1 of the α subunit impairs channel gating, whereas the opposite effect is observed for the same position in ϵ and δ subunits.

Furthermore, we demonstrate that there is a direct interaction between residues at 15' of M1 and 11' of M2 of the α subunit. This explains the relationship between the volume of the residue at 15' of M1 and the efficiency of channel: the increase in the volume of the residue at 15' of M1 may restrict the movement of M2 through its interaction with the residue at 11' of M2, thus leading to a reduction in channel gating efficiency.

Due to the low conductance of the 5-HT_{3A}R, different kinetics models proposed until now have been based on macroscopic currents. Using the high conductance form of this receptor (5-HT_{3A}R-HC) we recorded macroscopic currents and single-channel events. On the basis of these recordings we defined a kinetic model that closely describes the experimental data.

In addition, we introduced mutations at positions 10' and 14' of the M4 transmembrane segment of the 5-HT_{3A}R-HC. Residues at these positions have been shown to be important for the correct functioning of the AChR, and they show a particular conservation pattern among 5-HT₃R and AChR subunits. We demonstrate that these residues are important for the appropriate functioning of the 5-HT_{3A}R. Mutations at 10' of M4 affect the single-channel properties, and mutations at 14' of M4 affect the decay rate of macroscopic currents and the potency for activation.

With the single-channel data obtained for 5-HT_{3A}R-HC mutated at 10' of M4, we performed kinetic analysis on the basis of the scheme proposed in this thesis. The analysis reveals that mutations at 10' affect mainly opening and closing rates from the slowest open state. This result is similar to that previously reported for AChR, indicating that the function of this position is conserved among members of the same family.

Our results provide important information about the involvement of transmembrane segments in the correct functioning of receptors from the Cys-loop superfamily. These results reveal how the function of some amino acids has been conserved along evolution.

In conclusion, we defined the first kinetic model for the 5-HT_{3A}R, which perfectly represents the activation of this receptor at both macroscopic and single-channel level. Moreover, our kinetic model provides a foundation for studying the contribution of residues to receptor function and for understanding molecular mechanisms of drug modulation.

Índice

	Página
RESUMEN	I
SUMMARY	IV
INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
COMUNICACIÓN CELULAR.	1
SINAPSIS.	1
Sinapsis eléctrica.	2
Sinapsis química.	2
RECEPTORES SINÁPTICOS.	4
Receptores metabotrópicos.	4
Receptores ionotrópicos.	5
TRABAJO DESARROLLADO EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.	6
RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA.	7
ESTRUCTURA DEL AChR.	7
El dominio extracelular.	8
Los sitios de unión del agonista.	9
La región transmembranal.	11
El poro iónico.	12
La compuerta.	13
MECANISMO DE ACTIVACIÓN DEL AChR.	15
Gatillado.	15
Cinética de activación.	17
Modelo cinético.	19
Activación por ACh.	21
MODULACIÓN DEL AChR.	23
Principios generales de la modulación alostérica.	23
Modulación alostérica del AChR.	23
Agonistas.	24
Moduladores.	25
Bloqueadores.	27
<hr/>	
METODOLOGÍA	28
<hr/>	
SUBUNIDADES DEL RECEPTOR.	28
CULTIVO CELULAR.	28
CONSTRUCCIÓN DE LAS SUBUNIDADES MUTADAS.	28

EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES.....	29
REGISTROS DE <i>PATCH-CLAMP</i>	30
Registros de canal único.	30
Corrientes macroscópicas.	31
Cinética de recuperación de la desensibilización.	33
ANÁLISIS CINÉTICO.	34
Utilización de un agonista parcial.	36
ANÁLISIS DE ENERGÍA LIBRE EN EL EQUILIBRIO DURANTE EL GATILLADO.	37
CICLO DE DOBLE-MUTANTE.....	39
MODELADO.	39
SIMULACIÓN.	39
ESTADÍSTICA.	40
DROGAS.	40

CAPÍTULO I: ROL DEL SEGMENTO TRANSMEMBRANAL M1 EN EL GATILLADO DEL RECEPTOR DE ACETILCOLINA..... 41

INTRODUCCIÓN.	41
RECEPTORES DE ACETILCOLINA.	41
RECEPTORES DE ACh METABOTRÓPICOS.....	41
RECEPTORES DE ACh IONOTRÓPICOS.....	41
RECEPTOR NEURONAL DE ACh.	42
RECEPTOR MUSCULAR DE ACh.	43
OBJETIVOS.	45
DESARROLLO Y RESULTADOS.	46
I.1) ROL FUNCIONAL DEL RESIDUO 15' EN LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR.....	46
I.1.1) Mutaciones en la posición 15' de M1.....	47
I.1.2) Bases estructurales de los cambios cinéticos asociados a las mutaciones en M1.	51
I.1.3) Análisis de energía libre en el equilibrio durante el gatillado (REFER)..	52
I.2) INTERACCIÓN ENTRE M1 Y M2 DE LA SUBUNIDAD ALFA.	54
I.2.1) Mutaciones en 15' de M1 y 11' de M2 de la subunidad α	54
I.2.2) Análisis de doble mutante.	56
I.2.3) Confirmación del valor de θ_2 obtenido para el receptor mutado en 11' de M2.	57
a) Disminución de la expresión de receptores:	57
b) Bloqueo de los receptores presentes en el sello:.....	57
c) Utilización de un AChR mutante con ganancia de función:	58
d) Estudio del receptor mutado en α M2-L11'F activado por ACh:	60

DISCUSIÓN.	61
<hr/>	
CAPÍTULO II: MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT_{3A}.	66
<hr/>	
INTRODUCCIÓN.	66
FAMILIA DE RECEPTORES ACTIVADOS POR SEROTONINA.	66
RECEPTORES DE SEROTONINA ACOPLADOS A PROTEÍNA G.	68
RECEPTOR DE SEROTONINA TIPO 3.	69
OBJETIVOS.	75
DESARROLLO Y RESULTADOS.	76
II.1) CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT _{3A} DE ALTA CONDUCTANCIA.....	76
II.1.1) Activación por serotonina (5-HT).	76
Corrientes macroscópicas.	76
Registros de canal único.	78
Bloqueo del canal por 5-HT.	82
II.1.2) Activación del 5-HT _{3A} R por 2-metil-serotonina (2-Me-5HT).....	88
Corrientes macroscópicas.	89
Registros de canal único.	89
Bloqueo del canal por 2-Me-5HT.	92
II.1.3) Cinética de activación del receptor 5-HT _{3A} -AC.	93
Esquema cinético.	93
Modelo cinético.	102
Corrientes y canales simulados en base al esquema propuesto.	110
II.2) APORTE DE LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES AL FUNCIONAMIENTO DEL RECEPTOR. ROL DEL SEGMENTO TRANSMEMBRANAL M4.	115
Corrientes macroscópicas.	116
Registros de canal único.	118
Análisis cinético.	119
DISCUSIÓN.	121
<hr/>	
CONCLUSIONES GENERALES	128
BIBLIOGRAFÍA	131
ABREVIATURAS	146
PUBLICACIONES	149

Introducción

Introducción

COMUNICACIÓN CELULAR.

La supervivencia de los organismos superiores depende en gran medida de que sus células se organicen y actúen de manera sincronizada en órganos y tejidos para que los mismos cumplan sus funciones específicas. La **comunicación celular** es el proceso por el cual las células transmiten información a distancias significativamente variables para promover o modificar respuestas en otras células. Estas respuestas pueden ser excitadoras, inhibitoras o moduladoras.

A grandes rasgos, dos fases son esenciales en el proceso de comunicación celular: una **fase intercelular**, que abarca desde la liberación de una sustancia portadora del mensaje por parte de la célula efectora hasta que esta información llega a la célula que va a responder a dicha señal (célula receptora). En esta fase, los elementos clave son el "mensajero" (el cual se moviliza) y el "receptor" (específico para este mensajero). El receptor es fundamental en este proceso, y que la célula lo contenga le dará la posibilidad de responder a dicho mensaje. A este se le atribuyen importantes funciones, tales como i) reconocimiento específico del mensajero, ii) transducción de la señal a la célula efectora y iii) generación de la respuesta celular.

La segunda fase de la comunicación celular es la **fase intracelular**, la cual considera los procesos implicados en la producción de la respuesta. Sus elementos clave son los "segundos mensajeros" y sus "vías intracelulares". Esta intrincada red de señalización es crucial para que la célula comprenda y responda a su entorno.

SINAPSIS.

Un tipo de comunicación celular específica es la transmisión sináptica. Este tipo de comunicación es la vía de transmisión de mensajes en el sistema nervioso, por lo que es uno de los mecanismos de comunicación más avanzados a lo largo de la línea evolutiva de los seres vivos. La célula generadora del mensaje se denomina "pre-sináptica", y la receptora "post-sináptica". Durante mucho tiempo se consideró a la sinapsis como un medio de comunicación celular de naturaleza puramente eléctrica. Sin

embargo, a principios del siglo XX Otto Loewi (Premio Nobel de medicina, 1936) demostró la naturaleza química de la sinapsis al descubrir una sustancia que era liberada al medio y que podía generar la respuesta del efector en ausencia completa del emisor. Dicha sustancia fue denominada *vagusstoff* (Loewi y Navratil, 1926) por obtenerse al estimular el nervio vago, la cual es conocida actualmente como **acetilcolina**, uno de los neurotransmisores más extendidos en el sistema nervioso.

Existen dos tipos de sinapsis: eléctrica y química.

Sinapsis eléctrica.

Este tipo de sinápsis existe en menor proporción y aparentemente surgió primero a lo largo de la evolución debido a que es más abundante en organismos inferiores, tales como invertebrados (Okamura *et al.*, 2005). En estas sinapsis las conexiones entre las terminales pre- y post-sinápticas son continuas, debido a que sus membranas plasmáticas se mantienen estrechamente unidas por proteínas tubulares llamadas **conexinas** (Bruzzone *et al.*, 1996) (Figura 1). Estas moléculas actúan como túneles a través de los cuales transitan libremente agua, pequeños iones y moléculas; por ello, el estímulo es capaz de pasar directamente de una célula a la siguiente sin necesidad de mediación química. Gracias a esto, la sinapsis eléctrica ofrece una vía de baja resistencia entre neuronas, con un retraso mínimo en la transmisión del mensaje.

Las sinapsis eléctricas son menos abundantes en mamíferos, encontrándose en algunas neuronas del tronco encefálico, del cerebelo y de la retina.

Sinapsis química.

A diferencia de lo mencionado para la sinapsis eléctrica, aquí no existe una continuidad estructural entre las neuronas pre- y post-sináptica, sino que se encuentran separadas por un espacio de unos 20-40 nm denominado **hendidura sináptica**. Por lo tanto, resulta evidente que el mensajero liberado desde la membrana pre-sináptica debe viajar a través de dicha hendidura hasta alcanzar la membrana post-sináptica (Figura 1).

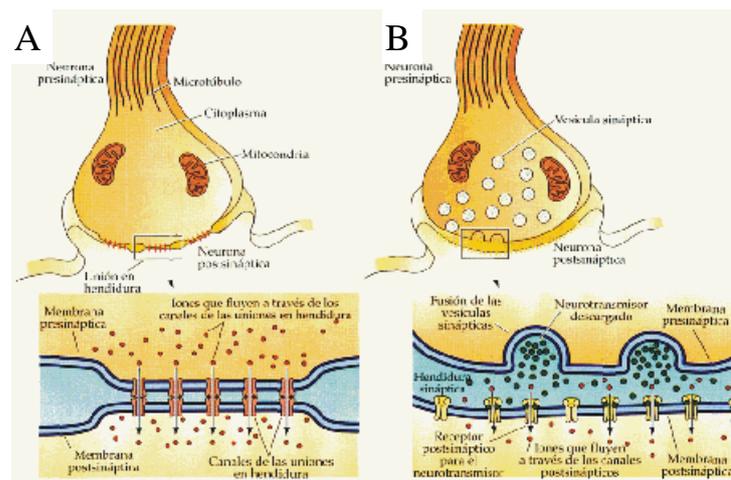


Figura 1: Tipos de sinapsis. Esquemas de los componentes en las sinapsis eléctrica (A) y química (B).

La terminal pre-sináptica posee en su citoplasma vesículas que contienen pequeñas sustancias químicas, las cuales actúan como mensajeros durante la comunicación neuronal, por lo que se denominan **neurotransmisores**. Al llegar el potencial de acción a la terminal, se produce la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El ingreso de Ca^{2+} estimula la fusión de dichas vesículas con la membrana pre-sináptica, liberando así los neurotransmisores hacia la hendidura sináptica. Luego de atravesar la hendidura, el neurotransmisor entra en contacto con la membrana post-sináptica, la cual está cubierta por una densa población de receptores que pueden observarse como una zona oscura al microscopio electrónico (Figura 2). Allí se encuentran los **receptores** específicos para el neurotransmisor liberado, los que serán responsables de transducir la señal hacia el interior celular para generar una **respuesta**.

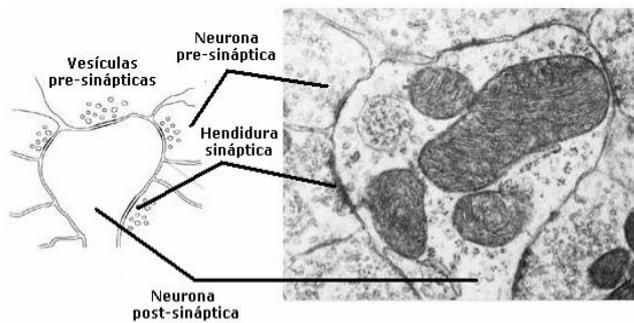


Figura 2: Sinapsis química. *Izquierda:* El esquema muestra las uniones de varias terminales pre-sinápticas sobre una terminal post-sináptica en representación de la imagen de la derecha.

RECEPTORES SINÁPTICOS.

La respuesta generada por el neurotransmisor estará específicamente relacionada con el tipo de receptor al que se una. Todos los receptores que participan en la transmisión de señales químicas son proteínas integrales de membrana que deben cumplir dos condiciones esenciales para su función: i) poder reconocer el mensajero y ii) acoplar dicho reconocimiento a un mecanismo que lleve a la respuesta. En base a esto, los receptores pueden ser divididos en dos grandes grupos: **metabotrópicos** y **ionotrópicos**.

Receptores metabotrópicos.

En estos receptores, el encargado de reconocer al mensajero es una unidad funcional diferente de aquella responsable de llevar la señal al interior celular. Estos receptores pertenecen a la familia de proteínas de siete segmentos transmembranales que se encuentran acopladas al complejo de proteínas G. La unión del ligando (primer mensajero) al receptor genera la activación del complejo proteína G, el cual transmite la señal activando o inhibiendo receptores de membrana o cascadas de señalización intracelular (segundo mensajero) (Figura 3). A este grupo de receptores pertenecen los receptores metabotrópicos de glutamato, receptores muscarínicos de acetilcolina, receptores del ácido γ -aminobutírico tipo B (GABA_B), y la mayoría de los receptores de serotonina (Purves R.D., 1976; Austin *et al.*, 1994; Felder C.C., 1995).

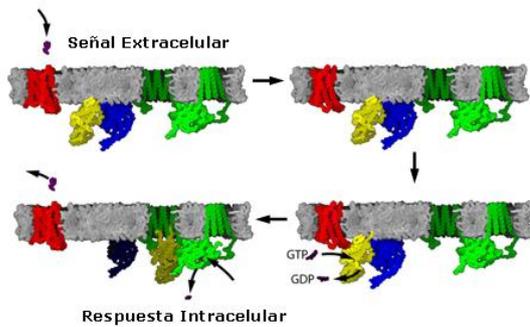


Figura 3: Representación general del mecanismo de acción de los receptores de membrana acoplados a proteína G.

Receptores ionotrópicos.

Estos receptores son proteínas integrales de membrana que constituyen canales para permitir el paso de iones al interior celular en respuesta al mensajero. Se agrupan en una amplia familia denominada "Canales Iónicos Activados por Ligandos", (**LGIC** : *Ligand-Gated Ion Channels*), que a diferencia de los receptores metabotrópicos, están involucrados en respuestas rápidas.

En base a la comparación de las secuencias de aminoácidos que constituyen todos los miembros de esta familia, se pueden distinguir tres grupos relacionados evolutivamente:

a) Canales catiónicos activados por glutamato: Constituido por los receptores AMPA, kainato y NMDA. Compuestos por cuatro subunidades homólogas, cada una contiene un segmento amino-terminal (NH_2), tres segmentos transmembranales con una pequeña región intra-membranal (*loop-P*), y un segmento extracelular carboxilo-terminal (COOH) (Figura 4).

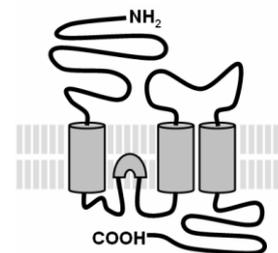


Figura 4

b) Canales activados por ATP: Comprende los receptores P2X, los cuales son canales permeables a cationes Na^+ y Ca^{2+} . Dichos receptores están constituidos por tres subunidades homólogas, cada una con sus extremos NH_2 - y COOH -terminal intracelulares, dos segmentos transmembranales, y un gran *loop* extracelular (Figura 5).

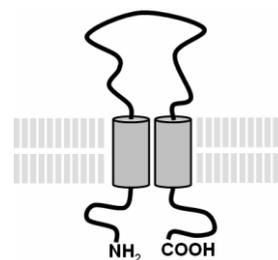


Figura 5

c) Receptores pertenecientes a la familia *Cys-loop*. Los miembros de esta familia están conformados por cinco subunidades homólogas, cada una de las cuales contiene un extremo NH_2 extracelular, cuatro segmentos transmembranales, un gran *loop* intracelular, y un extremo COOH extracelular corto

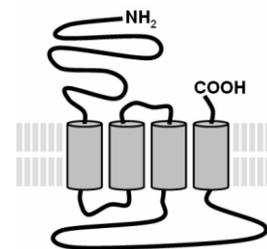


Figura 6

(Figura 6). Además, estas subunidades se caracterizan por presentar en su dominio extracelular NH_2 -terminal un puente disulfuro (S-S) entre dos residuos cisteínas separadas por 13 aminoácidos, lo que da el nombre de "*Cys-loop*" a esta familia. Los miembros que conforman dicha familia de receptores pueden dividirse en dos subgrupos: Un subgrupo conformado por receptores que permiten el paso de aniones, y por lo tanto son receptores "inhibitorios", entre los cuales están los receptores tipos A y C activados por el ácido γ -aminobutírico (GABA_AR y GABA_CR) y los receptores activados por glicina (GlyR); y un segundo subgrupo, el cual contiene receptores que permiten el paso de cationes, y por lo tanto "excitatorios", que comprende los receptores de serotonina tipo 3 ($5\text{-HT}_3\text{R}$), de acetilcolina (AChR) y los activados por cinc (ZAC).

TRABAJO DESARROLLADO EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue el estudio de los receptores excitatorios de acetilcolina (AChR) y de serotonina tipo 3 (5-HT_3).

El AChR es el modelo para todos los miembros de esta familia y se han realizado numerosos estudios para lograr conocer su mecanismo de activación y desactivación. A partir de dichos estudios se reportaron y caracterizaron diversos efectos provocados por mutaciones y moduladores sobre la funcionalidad de este receptor.

De la misma forma se ha estudiado el receptor 5-HT_{3A} , lo cual se ha limitado hasta el momento al análisis de corrientes macroscópicas, debido a la baja conductancia del canal.

En el presente trabajo identificamos y caracterizamos el aporte funcional del residuo 15' de M1 de las subunidades α , ε y δ del AChR, y

demostramos la interacción funcional entre los residuos F225 (15' de M1) y L253 (11' de M2) de las subunidades α que lo conforman.

Además, realizamos la primera caracterización a nivel de canal único del receptor 5-HT_{3A}, proponiendo así un esquema cinético que pueda explicar tanto su activación, como su desactivación y desensibilización. Evaluamos también cómo mutaciones realizadas sobre el segmento transmembranal M4 provocan cambios en su cinética.

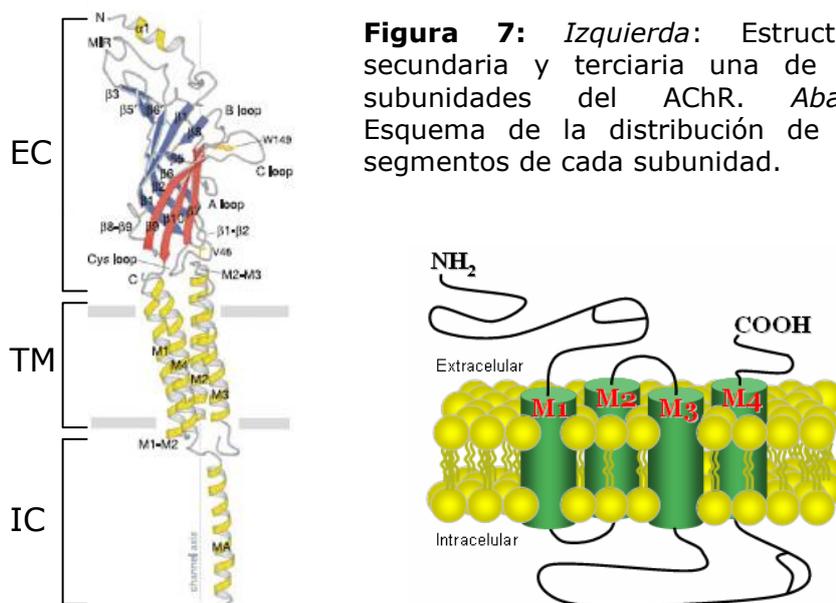
RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA.

Dentro de la familia de LGIC, el receptor más ampliamente estudiado, y considerado como el modelo para todos los miembros de esta familia, es el receptor de acetilcolina (AChR), el cual fue inicialmente clonado y secuenciado a partir del órgano eléctrico de *Torpedo californica* (Raftery *et al.*, 1980a; Giraudat *et al.*, 1982; Noda *et al.*, 1982; Claudio *et al.*, 1983). Diversos estudios llevaron a la identificación de un grupo de genes homólogos que codifican subunidades del receptor en músculo y cerebro, clasificando dichas subunidades en dos grandes grupos: i) **subunidades tipo α** : este grupo comprende las subunidades $\alpha 1$ - $\alpha 10$, cuya característica particular es la presencia de un puente disulfuro entre dos cisteínas adyacentes (C191 y C192) (Karlin y Akabas, 1995), y ii) **subunidades no α** : las cuales no presentan el puente disulfuro presente en las tipo α . Este grupo está constituido por las subunidades $\beta 1$ - $\beta 7$, γ , δ y ϵ (Jones *et al.*, 2003).

ESTRUCTURA DEL AChR.

Todas las subunidades de este receptor comparten una estructura terciaria similar. Dichas subunidades están conformadas por cuatro estructuras características: i) un gran segmento extracelular (EC) NH₂-terminal, ii) cuatro segmentos transmembranales M1-M4 (TM), donde los segmentos M2 de cada subunidad se alinean para conformar el poro del canal, iii) un

gran *loop* intracelular (IC) que conecta los segmentos M3 y M4, y iv) un corto segmento COOH-terminal extracelular (Figura 7) (Unwin N., 2005).



El dominio extracelular.

Este segmento contiene las estructuras responsables de la unión del agonista a partir de las cuales se transmite la información hacia el resto de la proteína para producir la apertura del canal (**gatillado**). Los estudios realizados para identificar y caracterizar dichas estructuras se centraron inicialmente en el receptor de *torpedo* (Unwin N., 1993; Unwin N., 1995; Miyazawa *et al.*, 1999). Estos estudios solo aportaron una visión de baja resolución de la proteína debido a su dificultad para lograr cristalizarla (máxima resolución = 4,6 Å). Luego de la identificación, aislamiento y cristalización de una proteína soluble obtenida a partir del molusco *Lymnaea stagnalis*, se obtuvo información detallada acerca de la estructura del segmento extracelular del receptor (Brejc *et al.*, 2001). Esta proteína soluble es capaz de unir ACh, por lo que se la denominó "proteína unidora de ACh" (**AChBP: ACh Binding Protein**), y su estructura secundaria y terciaria asemejan al segmento extracelular del AChR con un alto grado de homología (~20%). La AChBP es capaz de agruparse formando homopentámeros emulando perfectamente la zona extracelular del receptor completo, y a partir de su análisis cristalográfico se logró determinar su estructura con un alto grado de resolución (2,7 Å). En vista de estos

resultados, la AChBP fue utilizada como molde para obtener, por medio de modelado por homología, un modelo de alta resolución de la zona extracelular del receptor completo (Unwin N., 2005).

Cada monómero constituyente de la AChBP consiste en una hélice α NH₂-terminal, dos hélices β_{10} y 10 hojas β (β_1 - β_{10}) conectadas a través de igual número de *loops* (Figura 8). Estas estructuras β se agrupan en dos grandes grupos unidos a través de un puente disulfuro (*cys-loop*), conformando un núcleo hidrofóbico (Brejc *et al.*, 2001; Kalamida *et al.*, 2007) (Figura 8).

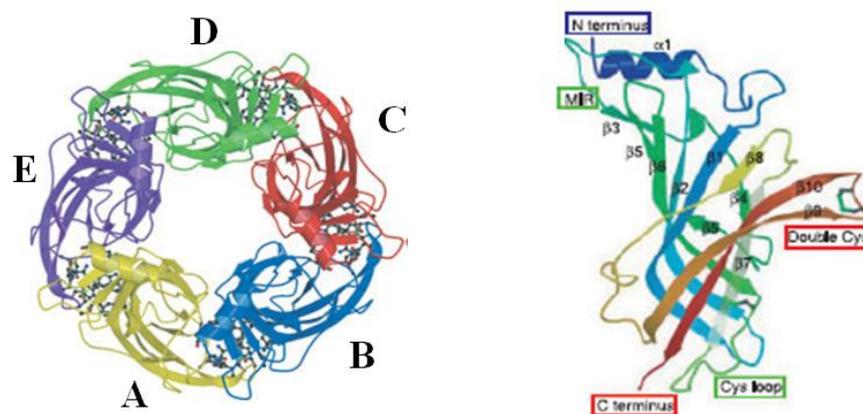


Figura 8: Estructura de la AChBP.

Izquierda: Vista superior del homopentámero AChBP. Cada subunidad se identifica en distinto color y con letras A-E. *Derecha:* Vista lateral de un monómero del complejo. Se identifica el *Cys-loop* característico de los miembros de la familia LGIC (recuadro verde inferior).

Los sitios de unión del agonista.

A partir de la estructura de la AChBP se determinó que los sitios de unión del agonista se localizan en las interfases entre cada una de las subunidades que conforman el pentámero (Brejc *et al.*, 2001). Dichos sitios están definidos por un conjunto de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos, cuya participación fue demostrada previamente en el AChR por medio de mutagénesis dirigida (Dennis *et al.*, 1988; Galzi *et al.*, 1991; Fu y Sine, 1994).

Diversos estudios de afinidad, utilizando tanto agonistas como antagonistas competitivos marcados, demostraron que el principal componente del sitio de unión a ligandos está constituido por las

La región transmembranal.

El complejo proteico formado por las cinco subunidades que constituyen el AChR atraviesa la membrana plasmática determinando cuatro segmentos transmembranales para cada subunidad, cuya estructura secundaria ha sido motivo de controversia por varios años.

Numerosos estudios propusieron inicialmente estructuras hoja- β plegada para los segmentos M1, M3 y M4 (Unwin N., 1993). Sin embargo, experimentos de marcación (Blanton y Cohen, 1992; Blanton y Cohen, 1994) y de microscopía electrónica (Miyazawa *et al.*, 2003; Unwin N., 2005) confirmaron finalmente que dichos segmentos adoptan una conformación α -hélice. Por cada subunidad existen cuatro hélices que atraviesan la membrana denominadas M1-M4 (Figuras 7 y 10). Estos segmentos transmembranales se orientan en forma concéntrica a un eje central que delinea el poro, siendo M2 el segmento más interno y el que conforma las paredes del canal. Detrás de M2 se ubican los segmentos M1 y M3, apareciendo M4 como el segmento más externo y el más expuesto a la interacción con los lípidos de la membrana plasmática (Figura 10) (Bouzat *et al.*, 2000; Bouzat *et al.*, 2002; Miyazawa *et al.*, 2003; Unwin N., 2005). Entre estos segmentos existirían espacios vacíos ocupados por algunas moléculas de agua.

De la inspección de la estructura resuelta a ~ 4 Å se propusieron ciertos puntos de interacción entre los segmentos M2 y M3 (L250-I296, L257-I289 y V261-V285) y entre M2 y M1 (L253-F225) de la subunidad α . Algunas de estas interacciones fueron identificadas experimentalmente mediante mutagénesis dirigida y análisis cinético durante el desarrollo de esta tesis (Corradi *et al.*, 2007; De Rosa *et al.*, 2008).

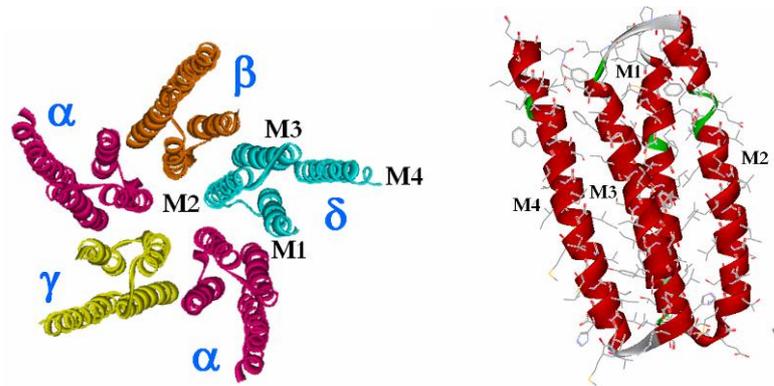


Figura 10: Disposición de los segmentos transmembranales.
Izquierda: Orientación de los segmentos transmembranales de las cinco subunidades del receptor vistas desde el espacio extracelular.
Derecha: Vista perpendicular al eje que delinea el poro (flecha) mostrando la disposición en la membrana de los cuatro segmentos de una subunidad (Miyazawa *et al.*, 2003).

Las hélices transmembranales se encuentran unidas entre sí por *loops*, los cuales tienen una importante participación en el correcto funcionamiento del receptor, tanto en la transmisión del mensaje posterior a la unión del agonista para provocar la apertura del canal, como en la cinética de desensibilización del receptor (Grutter *et al.*, 2005; Bouzat *et al.*, 2008). Además, el *loop* M3-M4 estaría asociado al citoesqueleto, lo que otorgaría al receptor una estructura de anclaje para dirigirlo hacia regiones apropiadas de la membrana (Paradiso y Brehm, 1998).

El poro iónico.

La región del receptor por la que transitan los iones (**poro**) se encuentra delimitada por los segmentos M2 de cada subunidad (Akabas *et al.*, 1994; Miyazawa *et al.*, 2003). Estos segmentos M2 contienen residuos homólogos que forman anillos a diferentes niveles a lo largo del poro (Figura 11). En general, se trata de residuos no polares que no presentan ninguna restricción al paso de iones, sin embargo, la selectividad del poro al paso de cationes (preferentemente Na^+ para el receptor muscular y Ca^{2+} para el neuronal) es indicio de un mecanismo de exclusión para otros iones. En los segmentos M2 de distintas subunidades se identificaron residuos cargados negativamente altamente conservados (Figura 11), los cuales constituyen anillos que serían los responsables de concentrar y conducir los cationes a

través del canal (Imoto *et al.*, 1988; Miyazawa *et al.*, 2003; Paas *et al.*, 2005; Cymes y Grosman, 2008).

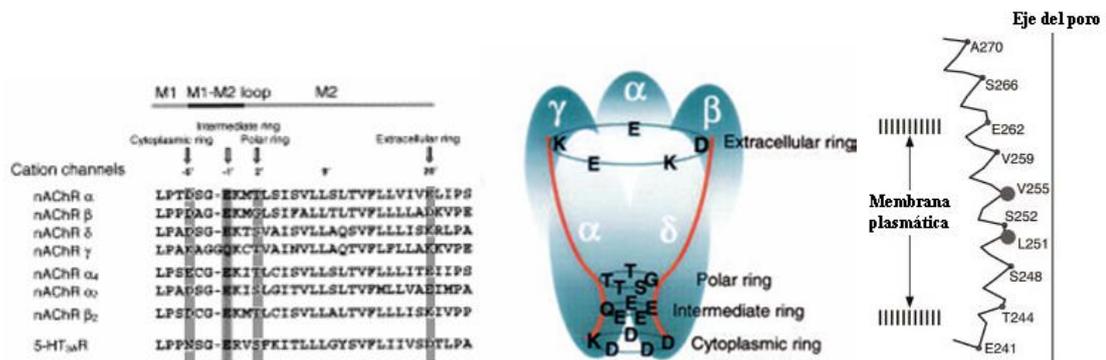


Figura 11: Estructura del poro iónico.

Izquierda: Residuos que conforman anillos cargados a lo largo del recorrido de los iones a través del canal (gris). *Centro:* Esquema de los distintos anillos y su ubicación a lo largo del poro. *Derecha:* Residuos de M2 de la subunidad α que se orientan hacia el interior del canal. Como esferas se remarcan aquellos que constituyen la compuerta del canal.

La porción intracelular del AChR contiene residuos cargados que producen un aumento en la concentración de cationes en las cercanías del poro. Dicha región presenta residuos de cargas opuestas en canales aniónicos, por lo que se lo considera el **filtro de selectividad** del receptor (Unwin N., 2005). Por otro lado, los espacios generados entre los *loops* M3-M4 de las distintas subunidades proporcionan un punto más de restricción al paso de iones, siendo por ello importantes en la determinación de la conductancia del canal (Unwin N., 2005). Esto también fue demostrado en estudios recientes realizados sobre los receptores 5-HT_{3A} y $\alpha 4\beta 2$ (Kelley *et al.*, 2003; Hales *et al.*, 2006). Dichos resultados confirmaron que el vestíbulo intracelular, además de contener el filtro de selectividad del canal, es importante para el control de la conductancia del mismo.

La compuerta.

Vimos que el receptor presenta a los iones del medio una vía medianamente selectiva a través de la cual estos pueden pasar, delimitando además la velocidad de dicho paso (**conductancia**). Sin embargo, el receptor debe ser capaz de determinar el momento preciso en

el cual los cationes deben atravesar el poro, para así controlar la respuesta fisiológica en la que está involucrado. Por ello, existe un mecanismo que bloquea el paso de los iones hasta que llega la señal del agonista promoviendo la apertura del canal. Este mecanismo consiste en una **compuerta** conformada por residuos hidrofóbicos que bloquean el paso de los iones cuando el receptor se encuentra cerrado.

La zona central del segmento M2 presenta una aproximación de las cadenas TM de todas las subunidades que conforman el poro. Se ha demostrado que a ese nivel existen dos residuos de α M2 que son clave para el control del paso de los iones, L251 y V255 (Hucho *et al.*, 1986; Imoto *et al.*, 1986; Miyazawa *et al.*, 2003) (Figura 11). Dichos residuos permanecen bien conservados dentro de **motivos** de aminoácidos de distintos miembros de esta familia de receptores, indicando su importancia para el funcionamiento de los mismos. Para el AChR se observa el patrón LxxxVxxxV/L para las distintas subunidades (residuos 9', 13' y 17'), el cual es similar al hallado en el receptor 5-HT₃ (LxxxVxxxI) (Lester H.A., 1992; Beckstein y Sansom, 2006). Motivos similares fueron reportados para receptores AChR en procariotas, lo que sugiere que dicho mecanismo fue desarrollado en forma temprana a lo largo de la evolución (Tasneem *et al.*, 2005; Bocquet *et al.*, 2007). La orientación de estos residuos, en conjunto con los de las demás subunidades, determina una zona estrecha a lo largo del poro iónico de $\sim 3 \text{ \AA}$, la cual impide el paso de iones Na⁺, K⁺ y Ca²⁺, dado que estos iones en estado de hidratación requieren un espacio de $\sim 8 \text{ \AA}$ para poder atravesar el canal (Miyazawa *et al.*, 2003). Si bien estudios posteriores realizados en segmentos M2 modelados *in silico* mostraron ciertas diferencias en la orientación e inclinación de dichos segmentos, la función del residuo L251 de la subunidad α fue confirmada como crucial en el proceso de apertura del canal (Kim *et al.*, 2004). Por medio de dichos estudios, se observó que cada residuo L251 de los cinco segmentos M2 se orienta hacia el interior del poro generando, aproximadamente a la mitad del mismo, una constricción que impide el pasaje de los iones (Figura 12). Resultados similares fueron demostrados para otros receptores de la familia LGIC, como el receptor 5-HT_{3A} (Panicker *et al.*, 2002; Lummis S.C., 2004).

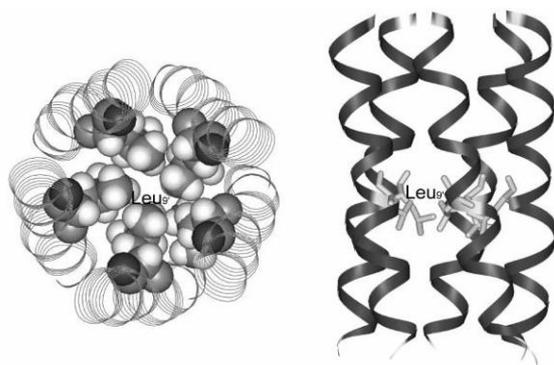


Figura 12: Compuerta del canal. Esquema de las hélices M2 obtenido por modelado molecular. Cada residuo L251 (Leu) se proyecta hacia el interior, generando una región estrecha a lo largo del poro (Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004).

MECANISMO DE ACTIVACIÓN DEL AChR.

Gatillado.

El paso de iones a través del poro del canal es facilitado por la unión del agonista al sitio específico del segmento extracelular del receptor. Una vez unido el agonista, la información debe ser enviada hacia la compuerta para producir su apertura (**gatillado**), lo que implica que el mensaje debe ser transmitido muy rápidamente a través de ~ 50 Å de distancia entre estos dos puntos. Varios trabajos han aportado información para entender los mecanismos que están implicados en dicha comunicación. Los cambios iniciados por la interacción del agonista con los residuos del sitio de unión serían transmitidos hacia los *loops* que conectan las estructuras β del segmento extracelular con las hélices α de la región transmembranal (Kash *et al.*, 2003; Bouzat *et al.*, 2004; Lester *et al.*, 2004; Jha *et al.*, 2007; Bouzat *et al.*, 2008). La introducción de mutaciones o el cambio en mayor o menor medida de los aminoácidos que los componen lleva a modificaciones en la capacidad de respuesta por parte del receptor, e incluso a la insensibilidad del mismo a la acción del agonista (Unwin *et al.*, 2002; Miyazawa *et al.*, 2003; Bouzat *et al.*, 2004; Lester *et al.*, 2004; Lee y Sine, 2005; Lummis *et al.*, 2005; Mukhtasimova y Sine, 2007; Bouzat *et al.*, 2008). Algunos de estos mecanismos fueron demostrados durante el desarrollo de este trabajo de tesis (Bouzat *et al.*, 2008) (Figura 13).

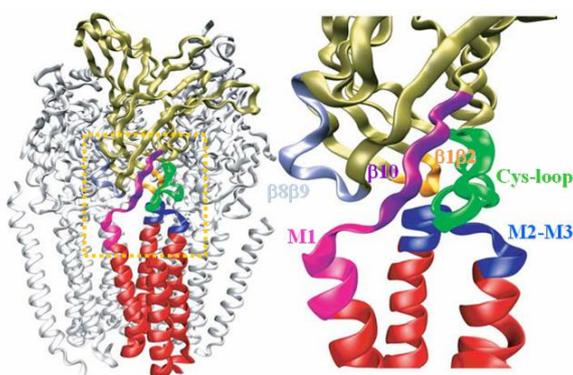


Figura 13: Interacción entre *loops* que conforman la interfase EC-TM.

Izquierda: AChR de *torpedo* a 4 Å ((Unwin N., 2005), PDB: 2bg9). En amarillo se observa el segmento EC y en rojo el TM. *Derecha:* Interacción entre los *loops* que constituyen la interfase entre los segmentos EC y TM (Bouzat *et al.*, 2008).

El movimiento transmitido por esta intrincada red de comunicaciones a través de los distintos *loops* sería responsable de la desestabilización de la estructura simétrica y ordenada de las hélices que conforman el poro. Los segmentos M2 de las subunidades α serían aparentemente los afectados inicialmente, llevando a la desestabilización de las hélices vecinas produciendo la apertura del poro del canal. Esta apertura puede ocurrir por una rotación en bloque de los segmentos M2 de unos 15° en sentido antihorario, como fue propuesto inicialmente (Miyazawa *et al.*, 2003), o un cambio en la inclinación de dichas hélices, que produciría la separación de los residuos que conforman la compuerta. Este movimiento aumentaría en ~ 1 Å la separación de los residuos de la compuerta, y sería suficiente como para provocar la apertura del canal (Beckstein *et al.*, 2003; Beckstein y Sansom, 2006; Hilf y Dutzler, 2008a; Hilf y Dutzler, 2008b) (Figura 14). Esto indicaría que no es necesaria la rotación de toda la hélice, sino solo un movimiento de la misma para producir la apertura del poro. Aparentemente, las subunidades α serían protagonistas principales en el proceso de gatillado del canal, mientras que las no α contribuirían durante la unión del agonista y en la estabilización del estado cerrado del receptor controlando así su correcto funcionamiento (Unwin N., 2005).

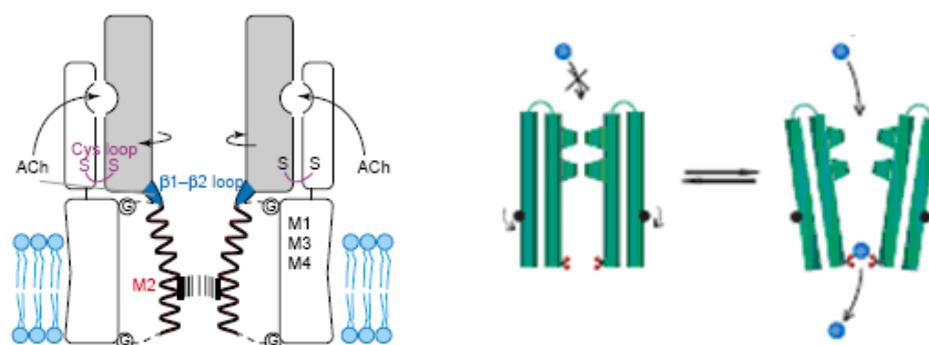
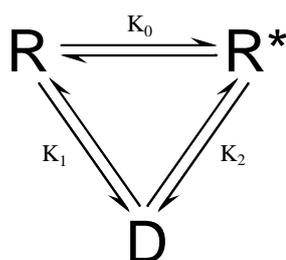


Figura 14: Proceso de gatillado del canal.

Izquierda: Esquema de dos subunidades α y sus respectivos segmentos M2 indicando la zona de la compuerta del canal. La unión del agonista genera una serie de movimientos que se transmiten a través de los distintos *loops* hasta provocar la rotación de las hélices M2 y la apertura de la compuerta (Lester *et al.*, 2004). *Derecha:* Representación esquemática del mecanismo de apertura del poro del canal provocado por un cambio en la inclinación de las hélices M2 (Hilf y Dutzler, 2008a).

Cinética de activación.

Como discutimos anteriormente, la unión del agonista al receptor genera una serie de cambios estructurales que promueven la apertura del canal. El AChR es una proteína alostérica, es decir, puede existir en distintos estados conformacionales interconvertibles, los cuales pueden ser estabilizados mediante la interacción con moduladores específicos. Este modelo fue propuesto inicialmente para explicar el comportamiento de proteínas que participan en reacciones enzimáticas (Monod *et al.*, 1965), sin embargo, luego fue aplicada y aceptada como una teoría adecuada para explicar el comportamiento de algunas proteínas de membrana, tales como el AChR (Karlín A., 1967a). Este concepto sostiene que, debido a las perturbaciones térmicas naturales, las proteínas pueden pasar de un estado a otro de forma espontánea. Un modelo sencillo que representa estos estados contiene tres componentes (Esquema 1), un estado de reposo (R) que corresponde al receptor cerrado y de baja afinidad por el agonista, un estado activo (R*) que corresponde al receptor abierto, y un estado desensibilizado (D) cerrado y de alta afinidad por el agonista. Para dicho esquema, K_0 , K_1 y K_2 representan las constantes de equilibrio para cada transición (Jackson M.B., 1992; Bertrand y Gopalakrishnan, 2007).



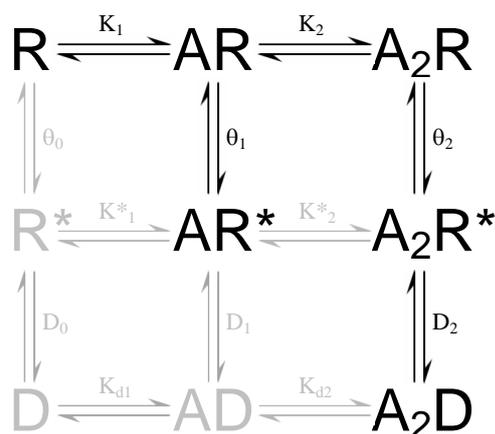
Esquema 1

El receptor en ausencia de agonista se encontraría mayoritariamente en estado de reposo. La unión del agonista estabilizaría el estado abierto, mientras que la unión de un antagonista estabilizaría el estado cerrado R. Una exposición prolongada al agonista estabiliza el estado D, donde el receptor no es conductor. La transición entre los estado R y R* llevaría finalmente a la apertura del poro, lo cual se revierte con la liberación del agonista y el retorno de la proteína a su estado de reposo (Miyazawa *et al.*, 2003; Bouzat *et al.*, 2004; Lester *et al.*, 2004; Unwin N., 2005; Giniatullin *et al.*, 2005). Por otro lado, poco se sabe acerca del estado D, el cual se ve favorecido en presencia prolongada del agonista. En vista de ello, su rol fisiológico a nivel de la unión neuromuscular no sería crucial debido a la breve exposición al agonista que experimentan los receptores allí presentes (Dilger y Liu, 1992; Auerbach y Akk, 1998). Además, al ser un proceso lento, algunos autores han propuesto, incluso, que dicho mecanismo no sería importante en la finalización de la respuesta sináptica debido al corto tiempo de exposición al agonista (Franke *et al.*, 1991), relacionándolo entonces con procesos de larga duración, tales como memoria y aprendizaje (Quick y Lester, 2002). Sin embargo, hemos demostrado recientemente su importancia en el control de la duración de la respuesta de los receptores homopentaméricos $\alpha 7$ y 5-HT₃ (Bouzat *et al.*, 2008). Algunos autores han propuesto que el fenómeno de desensibilización es un proceso intrínseco del receptor, ya que el mismo puede ocurrir en ausencia total de agonista aunque con muy baja probabilidad (Dilger y Liu, 1992; Franke *et al.*, 1993; Auerbach y Akk, 1998). Hasta el momento no se conoce el mecanismo por el cual el receptor alcanza dicho estado, aunque existe en la literatura un modelo que propone una estructura de doble compuerta, donde una de ellas gobierna la apertura y cierre del canal (R \leftrightarrow R*) y la otra lleva a la oclusión del poro por un mecanismo distinto,

provocando la desensibilización (Auerbach y Akk, 1998). Por otro lado, diversos estudios han demostrado la influencia de los niveles de Ca^{2+} intracelular en la modulación de la desensibilización, por lo que se ha propuesto una intervención de vías de señalización intracelular como factores importantes en el control de dicho proceso (Giniatullin *et al.*, 2005).

Modelo cinético.

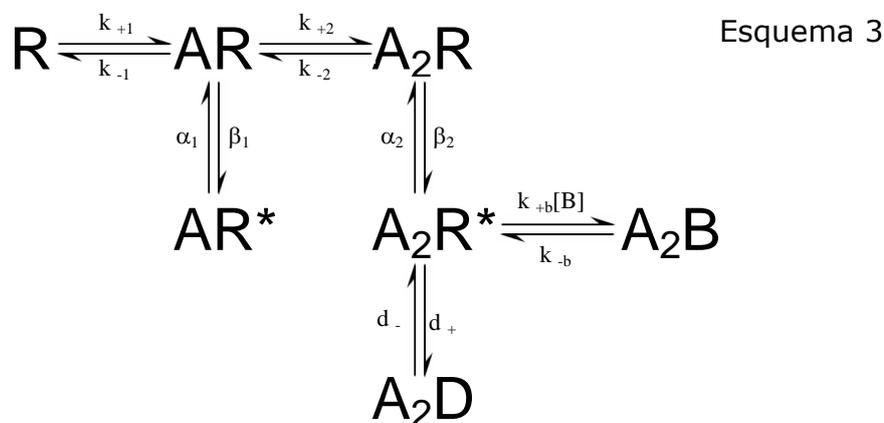
El AChR muscular ha sido el más caracterizado en cuanto a su cinética dentro de los miembros de esta familia de receptores. El modelo alostérico propuesto considera la unión de dos moléculas de agonista (A) por lo que el receptor puede existir en tres estados de reposo según se encuentre libre (R), con una (AR), o dos moléculas de agonista unidas (A_2R) (Esquema 2). A partir de cualquiera de estos tres estados el receptor podría pasar hacia el estado activo R^* . En vista de que la desensibilización es un proceso propio del receptor, este puede ocurrir también desde cualquiera de los estados antes mencionados. Para simplificar el esquema, solo fue considerado el estado desensibilizado a partir del estado activo de máxima ocupación (A_2D) (Esquema 2).



Esquema 2

K , K^* y K_d representan las constantes de afinidad por el agonista ($K_d > K = K^*$), y θ y D las constantes que indican la eficiencia con que el receptor pasa desde los estados de reposo hacia los estados R^* y D , respectivamente. Estas constantes aumentan a medida que el receptor une moléculas de agonista (Dilger y Liu, 1992; Franke *et al.*, 1993; Grosman y Auerbach, 2001).

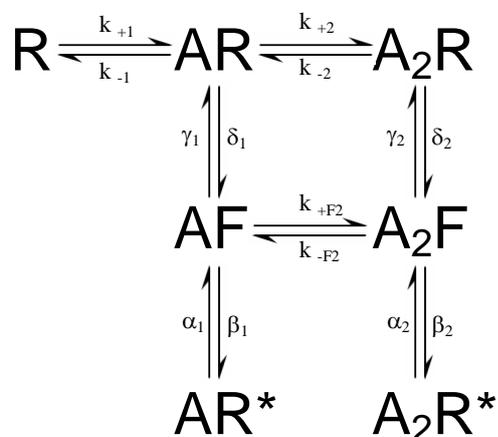
Los pasos en gris dentro del esquema 2 representan estados de baja probabilidad. Se ha demostrado que la desensibilización tiene más probabilidad de ocurrir a partir del estado bi-ligado, y que los receptores presentan una baja frecuencia de eventos espontáneos. Por lo tanto, el esquema puede simplificarse de la siguiente manera (Esquema 3).



k_+ y k_- son las constantes de asociación y disociación, respectivamente. β y α son las constantes de apertura y cierre del canal cuya relación indica la eficiencia con la que el receptor pasa hacia el estado activo correspondiente ($\theta = \beta/\alpha$). A altas concentraciones de agonista el receptor bi-ligado puede desensibilizarse y recuperarse de la desensibilización con velocidades d_+ y d_- respectivamente. Por otro lado, el agonista puede provocar el bloqueo del poro del canal, llevando al receptor a un nuevo estado A_2B no conductor. Todo esto determina el esquema clásico de activación del AChR (Esquema 3), ampliamente utilizado por más de dos décadas para explicar la cinética de activación del AChR muscular (Sine *et al.*, 1990; Dilger y Liu, 1992; Spitzmaul *et al.*, 2004).

Sin embargo, más recientemente, análisis realizados sobre receptores de glicina y posteriormente sobre el AChR muscular, llevaron a postular la presencia de un estado cerrado previo a la apertura del receptor denominado *flipped* (Colquhoun y Sivilotti, 2004; Lape *et al.*, 2008). Dicho estado fue interpretado a la luz de los registros de canal único obtenidos con ACh (agonista completo) y tetrametilamonio (TMA) (agonista parcial). En los registros de canal único obtenidos a partir de ambos agonistas se observaron eventos de apertura separados por cierres breves, dando lugar

a *bursts*, los cuales no podrían atribuirse a una deficiente capacidad de provocar la apertura del canal por parte del TMA. Los datos obtenidos fueron ajustados al esquema 4 y mostraron valores de θ_1 y θ_2 similares para ambos agonistas, justificando la diferencia en eficiencia en base a los valores de F obtenidos ($F = \delta/\gamma$), ya que $F_{ACh} > F_{TMA}$ (Lape *et al.*, 2008).



Esquema 4

Otros modelos conteniendo este estado intermedio (*flipped*) fueron propuestos también para receptores de glicina, tanto homoméricos como heteroméricos (Beato *et al.*, 2004; Colquhoun y Sivilotti, 2004; Colquhoun D., 2006; Lape *et al.*, 2008). Esto indicaría que dicho estado sería común para distintos miembros de la familia de receptores *Cys-loop*.

Activación por ACh.

A partir de los registros de canal único del AChR muscular se obtienen eventos cuya cinética ha sido explicada hasta el momento en base al esquema 3, donde a medida que aumentamos la concentración del agonista, se desplaza el equilibrio hacia la derecha, debido a que la unión del agonista va estabilizando los estados AR y A_2R (Esquema 3). De esta manera, a bajas concentraciones de agonista ($<10 \mu\text{M}$ de ACh), el receptor se activa como eventos aislados. A partir de los histogramas de aperturas se observan dos componentes de distinta duración, los cuales corresponden a los estados AR^* y A_2R^* ($\sim 0,2$ y ~ 1 ms, respectivamente) (Figura 15). A medida que aumentamos la concentración de ACh, el área del componente breve disminuye. A $10 \mu\text{M}$ de ACh los eventos de canal único se observan en grupos de aperturas separadas por cierres de aproximadamente 12 ms, que corresponden al componente mayoritario del histograma de cierres

(Figura 15). Dichos grupos de aperturas se denominan *clusters* y representan la transición reiterada entre los estados $A_2R \leftrightarrow A_2R^*$ hasta que finalizan por desensibilización (Sakmann *et al.*, 1980; Jackson *et al.*, 1983; Bouzat *et al.*, 2000; Bouzat *et al.*, 2002). Los cierres dentro del *cluster* corresponden a las transiciones entre el estado de reposo R y los estados abierto AR^* y A_2R^* . A medida que aumentamos la concentración de ACh aumentan las velocidades de asociación del agonista, haciendo que los cierres dentro del *cluster* se desplacen a tiempos más breves (Figura 15). Esto lleva a un aumento de la probabilidad de encontrar el canal abierto en el tiempo que dura dicho *cluster*, lo que se conoce como **probabilidad de apertura del canal** (P_{apertura}), la cual varía entre $\sim 0,1$ a ~ 1 , entre 10 y 300 μM de ACh, respectivamente. Los tiempos de estado abierto son constantes a todas las concentraciones de agonista, debido a que esta no influye en la velocidad de apertura ni de cierre del canal.

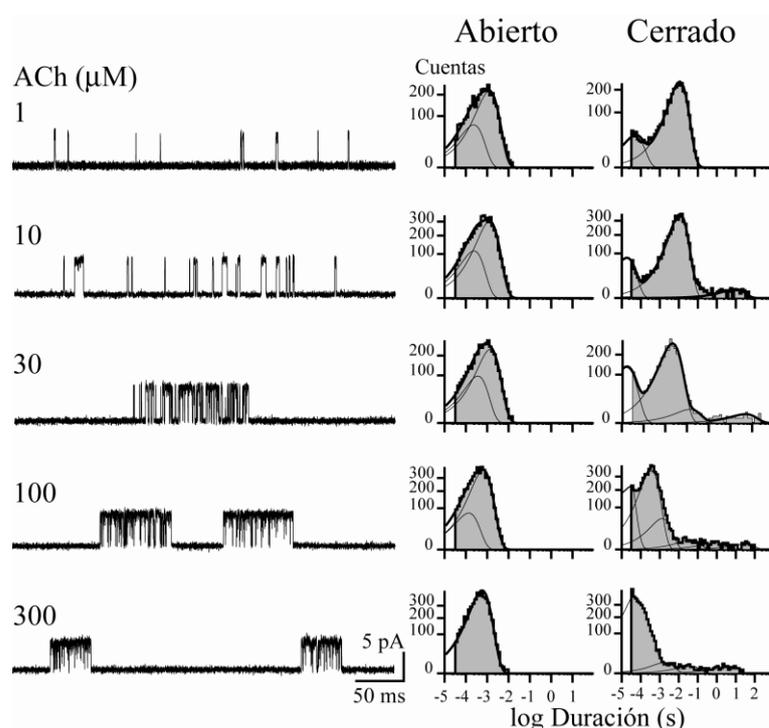


Figura 15: Activación del AChR por ACh.

Izquierda: Registros de canal único obtenidos a las concentraciones de ACh indicadas. Las aperturas se observan como deflexiones hacia arriba. Potencial de membrana: -70 mV, filtro 10 kHz. *Derecha:* Histogramas de estados abierto y cerrado para cada concentración. Se observa cómo el componente mayoritario del histograma de cierre se desplaza a tiempos más breves debido a la disminución del tiempo de cierre dentro del *cluster* en función de la concentración de ACh.

MODULACIÓN DEL AChR.

Principios generales de la modulación alostérica.

El término "alostérico" es ampliamente utilizado para indicar la interacción entre componentes de un complejo molecular, donde la acción de uno de ellos genera un efecto en el otro. Ejemplo de ello es la acción de moléculas que se unen a sitios específicos y afectan la posibilidad de unión de otras moléculas a sitios adyacentes. Otra acción alostérica sería la provocada por la unión de un ligando que se traduce en la respuesta del efector que forma parte del complejo, y ejemplo de ello son los canales iónicos, donde la unión del agonista produce la apertura de la compuerta del canal. Los complejos de proteína G, donde luego de unir al agonista la información se traduce a otros efectores, como un canal o una enzima, son también ejemplo de modulación alostérica.

El concepto inicial de alosterismo indicaba la transición de una molécula entre sus estados inactivo y activo provocada exclusivamente por la unión de la otra molécula integrante del complejo (receptor-agonista) (Del-Castillo y Katz, 1957). Una modificación a este concepto fue el modelo de Monod, Wyman y Changeux (MWC), el cual continúa siendo utilizado en la actualidad. Este modelo propone que la molécula principal (por ejemplo un receptor) puede transitar por los estados activo e inactivo tanto en presencia como ausencia de la molécula accesoria (por ejemplo, el agonista) (Monod *et al.*, 1965), y que la unión del ligando estabilizaría aquellos estados de mayor afinidad por el mismo. En el caso de un receptor, la unión del ligando estabilizará el estado abierto. La presencia del receptor en estado activo en ausencia del agonista, aunque con menor probabilidad, ha sido demostrada debido a la observación de aperturas espontáneas, confirmando de esta manera el modelo MWC. Si bien este modelo fue inicialmente desarrollado para estudiar reacciones enzimáticas, fue adecuado también para interpretar el comportamiento de receptores de membrana como el AChR (Karlin A., 1967b).

Modulación alostérica del AChR.

De lo expuesto anteriormente, se conoce que el receptor puede coexistir en sus diferentes estados (inactivo-activo-desensibilizado) (Esquema 1), y que

la unión de **agonistas** estabilizaría el estado abierto, mientras que la de **antagonistas** el estado cerrado.

Según el sitio que ocupen estos agentes moduladores en el receptor será el mecanismo utilizado para generar su acción. De esta manera, se definen como **moduladores competitivos** cuando dichas moléculas se unen al mismo sitio que el agonista (*sitio ortostérico*), y **moduladores no competitivos** si se unen a sitios diferentes respecto del sitio de unión del agonista (*sitio alostérico*).

Los ligandos que actúan sobre el sitio ortostérico pueden ser agonistas completos, agonistas parciales, inhibidores competitivos o antagonistas. En tanto, que aquellos que actúan sobre sitios alostéricos pueden definirse como moduladores positivos, negativos (o inhibidores no competitivos, INC), o bloqueadores.

Agonistas.

De acuerdo a la magnitud de la respuesta máxima provocada por el agonista, estos se pueden clasificar como **agonistas completos** o **agonistas parciales**.

Dentro de los agonistas completos, pueden existir entre ellos diferencias de afinidad o de eficacia, pero en todos los casos son capaces de generar la respuesta máxima del receptor (Figura 16). En cambio, los agonistas parciales no provocan la respuesta máxima, incluso estando a muy elevada concentración.

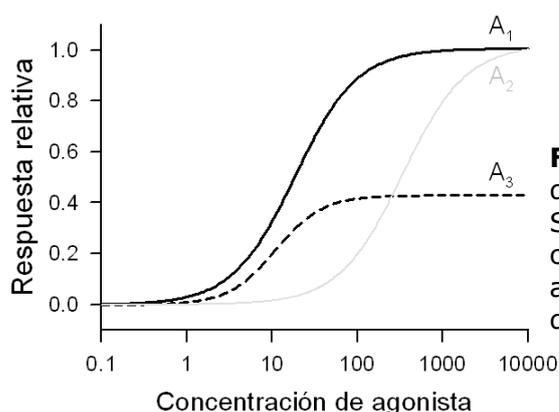


Figura 16: Respuesta generada por distintos agonistas.

Se muestran como ejemplo las respuestas obtenidas activando los receptores con A₁: agonista completo, A₂: agonista completo de menor eficacia y A₃: agonista parcial.

El estudio de agonistas parciales ha sido de importancia tanto para el entendimiento del comportamiento de ciertos receptores (Grosman y Auerbach, 2000a; Corradi *et al.*, 2007; Lape *et al.*, 2008), así como también en su uso práctico en medicina para el tratamiento de patologías donde existe sobre-estimulación de ciertos receptores debida, por ejemplo, al exceso de producción de agonistas endógenos (Zhu B.T., 2005), estos agonistas competirían por su unión al receptor, por lo que agregándolos en altas concentraciones se favorecería la unión del agonista parcial y se disminuiría la respuesta de dichos receptores (Zhu B.T., 2005).

Moduladores.

La unión de ciertos compuestos a sitios alostéricos del receptor afecta la barrera energética que separa dos estados conformacionales (por ejemplo: reposo-activo), generando un desplazamiento del equilibrio entre estos estados. Aquellos compuestos que disminuyen dicha barrera energética se los denomina **moduladores alostéricos positivos** (PAM: *Positive Allosteric Modulators*), como ivermectina, 5-hidroxiindol y genisteína, reportados como potenciadores de la actividad del receptor nicotínico $\alpha 7$ (Krause *et al.*, 1998; Zwart *et al.*, 2002; Charpantier *et al.*, 2005). Por otro lado, aquellos agentes que aumentan la barrera energética necesaria para la transición entre ambos estados se los denomina **moduladores alostéricos negativos** (NAM: *Negative Allosteric Modulators*), los cuales se conocen también como "inhibidores no competitivos (INC)".

La acción conjunta del agonista y un modulador alostérico conlleva a un aumento o una reducción de la potencia del agonista según el modulador utilizado. La acción de los PAM junto al agonista modifica la curva dosis-respuesta respecto de la obtenida activando solo con el agonista (Figura 17). En el ejemplo de la figura 17, la curva obtenida en presencia de un PAM muestra actividad de los receptores a baja concentración del agonista, incluso a concentraciones donde no existe actividad en la condición control (flecha), lo que expresa una alta tendencia por parte del receptor a permanecer en forma activa.

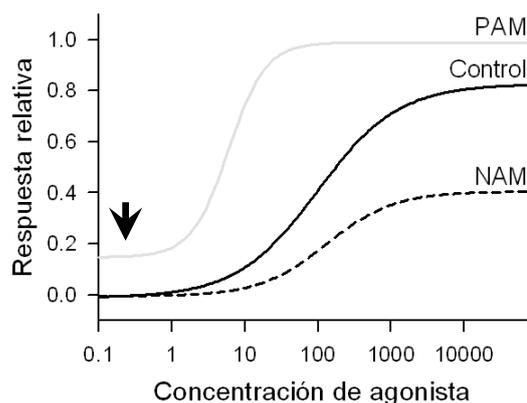


Figura 17: Moduladores alostéricos. Se observan los cambios en las curvas dosis-respuesta provocados por moduladores positivos (PAM) y negativos (NAM) respecto del control, al actuar a una concentración determinada conjuntamente con distintas concentraciones de agonista.

La presencia de los PAM lleva a un aumento de la eficacia normal del agonista, la cual se evidencia por el corrimiento de la curva a un valor de EC_{50} menor que el del control. Además, los receptores alcanzan la máxima activación más rápidamente, representado por una curva con mayor pendiente. En este caso, la máxima activación es mayor respecto de la curva control, mostrando un aumento en la potencia del agonista (Figura 17).

Lo opuesto ocurre con los NAM, donde los receptores no alcanzan el máximo de activación, incluso a altas concentraciones de agonista. Estos llevan a una disminución de la potencia del agonista sin afectar necesariamente su eficacia (Figura 17).

Algunos estudios han demostrado que ciertos **esteroides** producidos en el cerebro actúan como moduladores alostéricos del AChR, lo que indicaría su posible rol fisiológico en la regulación de la función del receptor. Su acción puede ser tanto positiva como negativa, dependiendo del tipo de esteroide y el receptor sobre el que actúe. Así se ha demostrado, por ejemplo, que la progesterona actúa como NAM sobre receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (Valera *et al.*, 1992), mientras que el 17- β -estradiol actúa como PAM sobre los receptores $\alpha 4\beta 2$ (Paradiso *et al.*, 2001). En cambio, este mismo esteroide actúa como inhibidor del receptor 5-HT₃ (Oz *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la hidrocortisona actúa como modulador del receptor ACh muscular, tanto de músculo adulto como embrionario, donde produce una reducción del tiempo de estado abierto del canal. Su efecto sobre el receptor fue atribuido a su acción como NAM, y su mecanismo fue explicado en base a su acción como bloqueador del canal (Bouzat y Barrantes, 1996).

Bloqueadores.

Un tipo particular de NAM son aquellos compuestos que generan su efecto modificando la capacidad del poro del receptor de conducir los iones. Estos actúan llevando al receptor a un nuevo estado no conductor (bloqueo).

Distintos compuestos han mostrado este comportamiento sobre el AChR, donde presentan afinidad por el poro del receptor en estado abierto (Neher y Steinbach, 1978; Giraudat *et al.*, 1986; Bouzat C., 1996; Bouzat y Barrantes, 1996; Spitzmaul *et al.*, 2001). Otros, en cambio, se unen al poro del canal tanto estando el receptor en estado abierto como cerrado (Papke y Oswald, 1989; Dilger *et al.*, 1997; Gumilar y Bouzat, 2008).

Metodología

Metodología

Esquema general

- ✓ Expresión del receptor de interés (salvaje ó mutado) en células en cultivo.
- ✓ Registros de *patch-clamp* en las configuraciones *outside-out* (para corrientes macroscópicas) y *cell-attached* (para canal único).
- ✓ Análisis de los registros obtenidos.
- ✓ Interpretación de los resultados.
- ✓ Conclusiones

SUBUNIDADES DEL RECEPTOR.

Mediante la utilización del vector pRBG4 incorporamos las secuencias de ADNc para las distintas subunidades de los receptores estudiados. Utilizamos las siguientes subunidades de ratón subclonadas en dicho vector: pRBG4- α 1; pRBG4- β 1; pRBG4- δ ; pRBG4- ϵ y pRBG4-5ht3a. Además, utilizamos el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) para reconocer las células transfectadas (pRBG4-GFP).

CULTIVO CELULAR.

Utilizamos células HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) y BOSC 23, las cuales crecen en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina-estreptomina). Estas células se incubaron a 37° C en atmósfera controlada de CO₂ al 5%.

CONSTRUCCIÓN DE LAS SUBUNIDADES MUTADAS.

Para la obtención de subunidades conteniendo mutaciones, las cuales se diseñaron para investigar el aporte de determinados residuos al comportamiento normal del receptor, utilizamos la técnica de PCR. Para ello diseñamos *primers* conteniendo las correspondientes bases cambiadas respecto de la secuencia salvaje. Para dicha técnica utilizamos el equipo comercial Quik Change™ (Stratagene, La Jolla, CA), confirmando el la secuencia final por secuenciación.

EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES.

Para la expresión de receptores utilizamos un sistema de expresión transitoria (Bouzat *et al.*, 1994). Los vectores conteniendo las secuencias de ADNc de las subunidades necesarias para la constitución de cada receptor se incorporaron por medio de la técnica de transfección por precipitación con fosfato de calcio (Bouzat *et al.*, 1994; Bouzat *et al.*, 2000; Bouzat *et al.*, 2002). Para ello utilizamos cultivos celulares al 20-30% de confluencia. El precipitado se dejó en contacto con el cultivo entre 8-12 hs. Transcurrido ese tiempo, se cambió el medio de cultivo y se incubaron las células durante 24-72hs a 37°C y 5% de CO₂ para permitir la expresión de los receptores en superficie. Luego se utilizaron estos cultivos para los estudios electrofisiológicos.

Para los estudios del AChR la mezcla de transfección contenía las cuatro subunidades que lo constituyen ($\alpha:\beta:\epsilon:\delta$) en la relación 2:1:1:1 respectivamente (Bouzat *et al.*, 1994; Bouzat *et al.*, 2000; Bouzat *et al.*, 2002).

Para el receptor de serotonina 5-HT_{3A}, la mezcla de transfección solo contenía el vector con la subunidad A, agregando 5 μ g de ADN por cápsula.

Junto con las subunidades correspondientes a cada receptor agregamos en todos los casos pRBG4-GFP (pGren lantern) que lleva a la expresión de una proteína fluorescente, la cual proporciona color verde a la célula que la contiene al ser iluminada con luz ultravioleta evidenciando las células transfectadas (Figura 18).

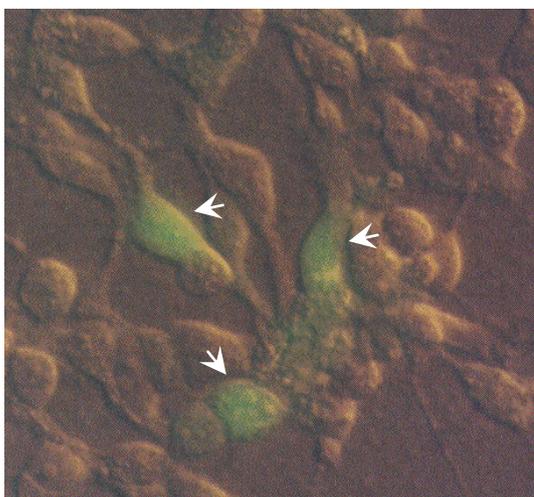


Figura 18: Células HEK observadas con luz ultravioleta bajo microscopio óptico. En verde se observan aquellas que luego de la transfección expresan GFP (flechas).

REGISTROS DE *PATCH-CLAMP*.**Registros de canal único.**

Los registros se obtuvieron en la configuración *cell-attached* (Hamill *et al.*, 1981) a un potencial de membrana de -70 mV a 20° C (Figura 4). Para los registros obtenidos de AChR, las soluciones de baño y de pipeta contenían: 142 mM de KCl; 5,4 mM de NaCl; 1,8 mM de CaCl₂; 1,7 mM de MgCl₂ y 10 mM de HEPES; pH 7,4. Sin embargo, para minimizar el bloqueo del poro del receptor 5-HT_{3A} producido por cationes divalentes (Ca²⁺ y Mg²⁺) (Brown *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2006; Livesey *et al.*, 2008), el *buffer* utilizado contenía 142 mM de KCl; 5,4 mM de NaCl; 0,2 mM de CaCl₂ y 10 mM de HEPES; pH 7,4.

Utilizamos pipetas de vidrio de resistencia entre 5-7 MΩ obtenidas a partir de tubos capilares de borosilicato (Garner Glass Co, Claremont, CA), pulidas por calor para suavizar la terminación de la punta y revestidas con Sylgard (Dow Corning, Midland, MI) para minimizar el ruido al disminuir la capacitancia del vidrio dentro de la solución de baño. Las soluciones conteniendo las drogas utilizadas se agregaron disueltas en el correspondiente *buffer*.

Las corrientes de canal único se registraron utilizando un amplificador Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Union City, CA), se digitalizaron a intervalos de 5 μs por medio de una interface PCI-6111E (National Instruments, Austin, TX), y fueron transferidas a la computadora por medio del programa Acquire 4.0.8 (Bruyton Corporation, Seattle, WA) (Figura 19).

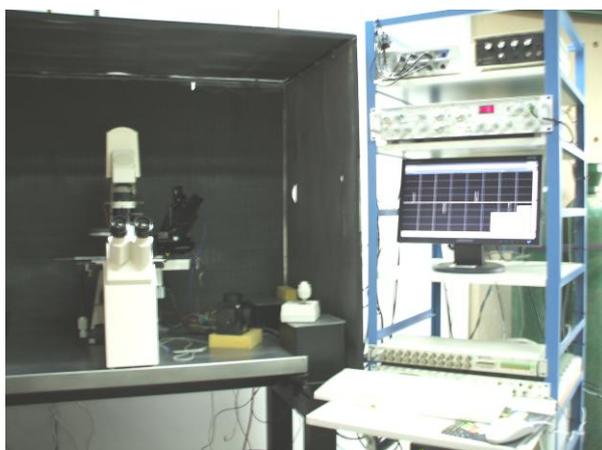


Figura 19: Equipo de *patch-clamp* utilizado para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

Una vez digitalizados, los registros fueron analizados por medio del programa TAC 4.0.10 (Bruyton Corporation, Seattle, WA) utilizando el criterio de umbral de amplitud media, a una frecuencia de 10 kHz. De este análisis obtuvimos histogramas para los estados abierto y cerrado graficados en escala logarítmica. Estos histogramas muestran el logaritmo de la duración de los eventos en las abscisas y el número de eventos para cada tiempo en las ordenadas. El ajuste se logra mediante la suma de las funciones exponenciales por máxima probabilidad utilizando el programa TacFit 4.0.10 (Bruyton Corporation, Seattle, WA).

La probabilidad de apertura (P_{apertura}) fue determinada experimentalmente calculando el tiempo en que el receptor permanece abierto dentro del tiempo total de duración del *cluster*.

Corrientes macroscópicas.

Fueron registradas en la configuración *outside-out* (Figura 20) a un potencial de membrana de -50 mV. La solución de pipeta (intracelular) en este caso contenía 140 mM de KCl; 5 mM de EGTA; 5 mM de MgCl₂ y 10 mM de HEPES; pH 7,3. Por otro lado, la solución de perfusión (extracelular) contenía 150 mM de NaCl; 5,6 mM de KCl; 0,5 mM de CaCl₂ y 10 mM de HEPES; pH 7,3. Una vez más, utilizamos solución extracelular con bajos niveles de cationes divalentes para disminuir el bloqueo del poro del receptor 5-HT_{3A}.

Las configuraciones utilizadas de la técnica de *patch-clamp* se encuentran esquematizadas en la figura 20.

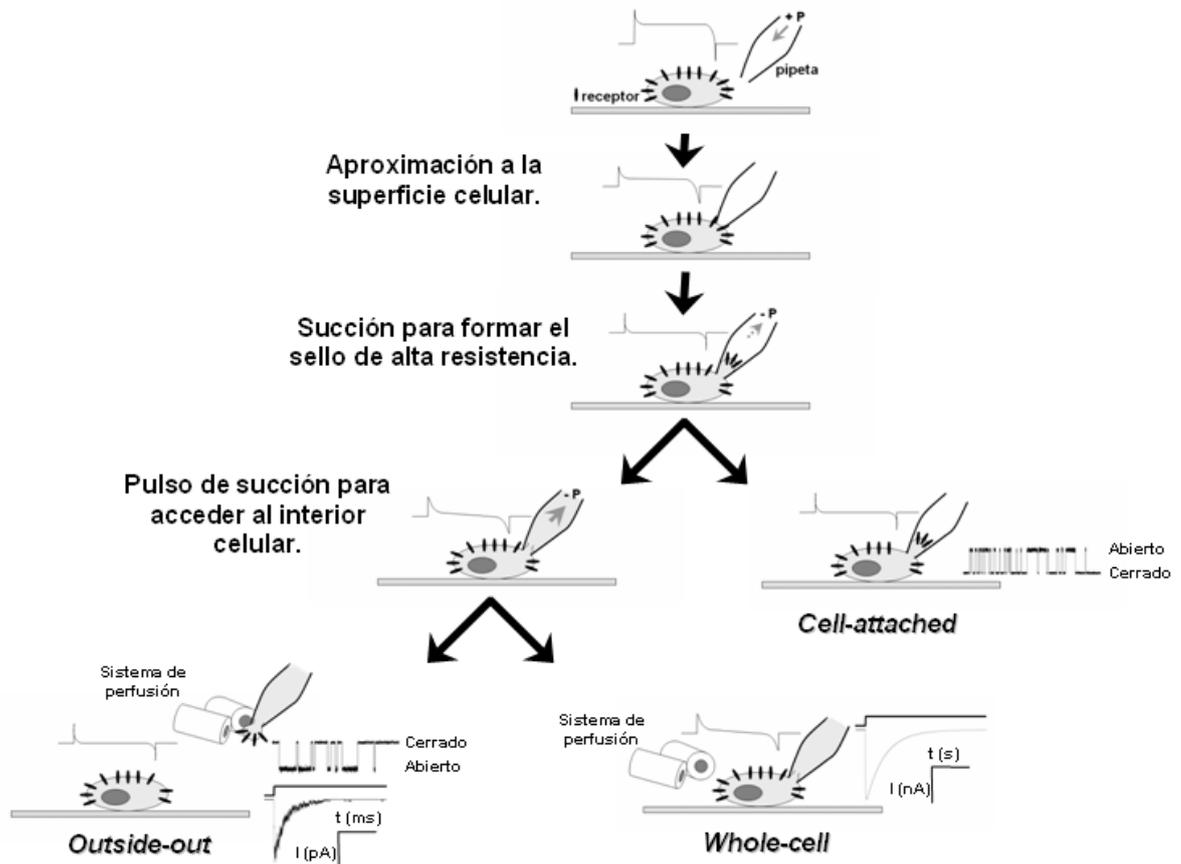


Figura 20: Configuraciones para la técnica de *patch-clamp*.

El esquema representa las distintas configuraciones utilizadas en este trabajo para la obtención tanto de los registros de canal único como de las corrientes macroscópicas.

Para la obtención de corrientes macroscópicas en configuración *outside-out*, la pipeta fue cargada con solución intracelular (ICS) y luego de lograr el sello de alta resistencia, se aplicó un pulso de presión negativa (-P) para acceder al interior celular. Luego se retiró suavemente la pipeta permitiendo la separación de un fragmento de membrana conteniendo receptores en ella, el cual se vuelve a sellar formando una vesícula. Esta fue llevada hasta la salida del sistema de perfusión, el cual permite el intercambio rápido de soluciones (0,1-1 ms) (Figura 20) (Spitzmaul *et al.*, 2001; Gumilar *et al.*, 2003). Las soluciones conteniendo agonistas, las drogas a evaluar o una combinación de ambos se agregaron externamente a través del sistema de perfusión activando la totalidad de receptores presentes en la vesícula (*outside-out*), obteniendo así una corriente macroscópica (Figura 20). Estas corrientes fueron filtradas a 5 kHz, digitalizadas a 50 kHz y almacenadas en la computadora para su posterior

análisis. Dicho análisis lo realizamos utilizando el programa IgorPro (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR). Cada corriente utilizada (n) es en realidad el promedio de 5-10 corrientes consecutivas obtenidas a partir del mismo sello. El análisis se realizó ajustando las corrientes a una función mono-exponencial:

$$I_{(t)} = I_0 [\exp(-t / \tau_d)] + I_\infty \quad \text{Ecuación 1}$$

Para los registros obtenidos a partir de células expresando el receptor 5-HT_{3A}, las corrientes obtenidas a concentraciones inferiores a 10 μ M fueron ajustadas por medio de la ecuación 1. Sin embargo, a concentraciones superiores se logró un mejor ajuste utilizando una función bi-exponencial (Mott *et al.*, 2001):

$$I_{(t)} = I_{\text{rápido}}[\exp(-t / \tau_{\text{rápido}})] + I_{\text{lento}}[\exp(-t / \tau_{\text{lento}})] + I_\infty \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde I_0 , $I_{\text{rápido}}$ e I_{lento} corresponden a la cantidad de corriente para cada componente, I_∞ es la corriente en el estado estacionario, y τ_d , $\tau_{\text{rápido}}$ y τ_{lento} , el tiempo de caída de cada componente "I".

Para cuantificar la eficiencia del agonista para activar al receptor, obtuvimos el valor de EC₅₀ (dosis efectiva 50). Para ello graficamos curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de las corrientes macroscópicas registradas a distintas concentraciones de agonista. Relacionando la cantidad de corriente (I) a una determinada concentración de agonista (L) en base a la corriente máxima alcanzada ($I_{\text{máx}}$) se obtiene una relación sigmoidea, la cual ajustamos a la ecuación de Hill:

$$I / I_{\text{máx}} = 1 / [1 + (EC_{50} / L)^{nH}] \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde nH es el coeficiente de Hill.

Cinética de recuperación de la desensibilización.

Para evaluar la cinética de recuperación desde el estado desensibilizado para el receptor 5-HT₃, utilizamos un protocolo de doble pulso en corrientes

obtenidas en la configuración *outside-out*. Aplicamos un pulso de 1,5 s conteniendo solución de 5-HT 3 ó 10 μ M. Terminado el pulso aplicamos un tiempo de lavado con *buffer* para remover el agonista, el cual varió desde 0,5 a 16 s permitiendo así distintos grados de recuperación. Luego del lavado aplicamos un segundo pulso de agonista. Graficando la fracción de corriente recuperada en función del intervalo de tiempo entre el primer y el segundo pulso obtuvimos una curva de recuperación sigmoidea, lo que indica un mecanismo que implica varios pasos para regresar al receptor desde el estado desensibilizado hasta el de reposo. La curva fue ajustada a la ecuación de van Hooft (van Hooft y Vijverberg, 1996):

$$I_{\text{rec}}(t) = a \times [1 - \exp(-t / \tau_{\text{rec}})]^n \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde I_{rec} es la fracción de corriente recuperada entre el primer y el segundo pulso para cada tiempo (I_2/I_1), a es la máxima recuperación respecto del control, t (s) es el intervalo de tiempo entre pulsos, τ_{rec} (s) es la constante de recuperación y n es el número de pasos dependiente de la concentración de agonista que llevan al receptor desde el estado desensibilizado al de reposo.

ANÁLISIS CINÉTICO.

Tanto para el AChR como 5-HT_{3A}R el análisis cinético fue restringido al estudio de los *clusters*, que corresponden a la activación de una única molécula de receptor (ver Introducción). Los *clusters* fueron identificados como eventos sucesivos de aperturas separados por cierres breves inferiores al tiempo crítico, considerado como el tiempo límite entre los cierres que pertenecen de los que no pertenecen al *cluster* (τ_{crit}). La determinación de dicho tiempo crítico se realizó en base a la distribución de los distintos componentes que conformaron los histogramas de estado cerrado.

Para el AChR este tiempo corresponde a la intersección entre el componente de cierre mayoritario y el sucesivo más lento.

Por otro lado, para el receptor 5-HT_{3A} el análisis cinético fue además realizado sobre los *bursts*, que también reflejan la activación de una única molécula de receptor (Rayes *et al.*, 2005). Por lo tanto, para la

identificación de *bursts* y *clusters* fueron considerados dos tiempos críticos, el de *burst* (τ_{crit}^b) el cual corresponde a la intersección entre el segundo y tercer componente del histograma de cierres, y el tiempo crítico de *cluster* (τ_{crit}^c) el cual se obtuvo de la intersección entre el tercer y cuarto componente dentro del histograma de cierre (ver Figura II.9).

En todos los casos, el valor del tiempo crítico fue confirmado resolviendo la ecuación $\exp(-\tau_{\text{crit}}/t_1) = [1 - \exp(-\tau_{\text{crit}}/t_2)]$ por medio del programa MAPLE 7 (Waterloo Maple, Ontario, Canada). Donde t_1 y t_2 son los tiempos de cierre previo y sucesivo al tiempo crítico considerado (Colquhoun y Sakmann, 1985; Grosman y Auerbach, 2001). La probabilidad de apertura dentro del *burst* y el *cluster* (P_{apertura}) fue determinada experimentalmente a cada concentración de agonista calculando la fracción de tiempo que el canal permanece abierto respecto del tiempo de duración del *burst* o el *cluster*, respectivamente. Solo fueron considerados *bursts* y *clusters* conteniendo más de 5 eventos, y aquellos que presentaron eventos dobles fueron descartados.

Para mutaciones que presentaron una muy baja P_{apertura} ($\alpha\text{M2-L11}'\text{F}$ para el AChR) utilizamos registros con muy baja actividad para asegurar la selección de *clusters* conformados por la activación de una única molécula de receptor. Para ello se redujo el tiempo de expresión luego de la transfección, realizando los registros de canal único inmediatamente después de la remoción del precipitado de fosfato de calcio.

Para encontrar un modelo cinético que refleje la activación de estos *clusters* y *bursts*, y obtener las velocidades de las transiciones para cada estado ajustamos los histogramas experimentales a curvas teóricas obtenidas en base a los cálculos realizados por el programa MIL (www.qub.buffalo.edu, QuB Suite, Buffalo, NY). El programa permite ajustar simultáneamente distintos histogramas experimentales y calcula las constantes cinéticas usando algoritmos de máxima similitud que corrige para eventos perdidos (Qin *et al.*, 1996). Las funciones de densidad teórica para los tiempos de estado abierto y cerrado fueron calculadas por el programa a través del ajuste de las constantes de velocidad y el tiempo de máxima resolución del equipo de *patch-clamp*, el cual fue de 30 μs . El modelo propuesto y las velocidades calculadas fueron aceptadas si las

funciones de densidad teóricas ajustaron correctamente los histogramas experimentales de estado abierto y cerrado.

Utilización de un agonista parcial.

La velocidad de apertura del receptor salvaje AChR (β_2) se encuentra en el límite de resolución del equipo de *patch-clamp* (50.000 s^{-1}), por lo que un aumento de dicha velocidad no podría ser detectado por esta técnica. En el presente trabajo, la mayoría de las mutaciones realizadas sobre el AChR llevaron a un aumento en la constante de gatillado del canal que podía deberse a un aumento en la velocidad β_2 , haciendo que muchos de los cierres no sean resueltos por el equipo. Por tal motivo, utilizamos colina 20 mM para el análisis cinético del receptor salvaje y mutante. Este es un agonista parcial del receptor de acetilcolina, el cual produce la apertura del canal con muy baja eficiencia, mostrando una velocidad β_2 unas 600 veces más lenta que con ACh (Zhou *et al.*, 1999; Grosman y Auerbach, 2000a). A esta concentración los registros muestran aperturas en *clusters* con una conductancia menor que con ACh debido al bloqueo rápido del canal. Los registros se analizaron a 5 kHz y los histogramas de cierre y apertura se ajustaron al esquema conteniendo un estado cerrado biligado y un abierto biligado (Esquema 5) mediante el programa MIL, debido a que 20 mM es una concentración saturante para este agonista (Grosman y Auerbach, 2000a; Spitzmaul *et al.*, 2004), haciendo que los pasos de asociación sean despreciables.



Donde A_2R es el receptor en el estado biligado cerrado, A_2R^* el receptor biligado abierto, β_2 y α_2 son las constantes de apertura y cierre, respectivamente. De la relación entre ambas constantes surge la **constante de gatillado del canal** ($\theta_2 = \beta_2 / \alpha_2$), la cual es índice de la facilidad con la que el receptor cambia entre estos dos estados (**eficiencia**).

ANÁLISIS DE ENERGÍA LIBRE EN EL EQUILIBRIO DURANTE EL GATILLADO.

La energía libre de los componentes de una reacción cambia luego de que éstos sufren cierta perturbación. El AChR para alcanzar el estado abierto debe transitar por tres estados definidos en forma simplificada como, cerrado, intermedio (o de transición) y abierto, lo cual implica modificaciones en su energía libre (Figura 21). Cuando el receptor sufre algún tipo de perturbación (por ejemplo una mutación), la energía libre de cada estado cambia respecto del estado basal (salvaje), generándose para dichos estados un **cambio de energía libre** (ΔG), donde el ΔG en el estado de transición es el "factor determinante" del cambio total de energía entre los estados abierto y cerrado (Cymes *et al.*, 2002; Grosman C., 2002).

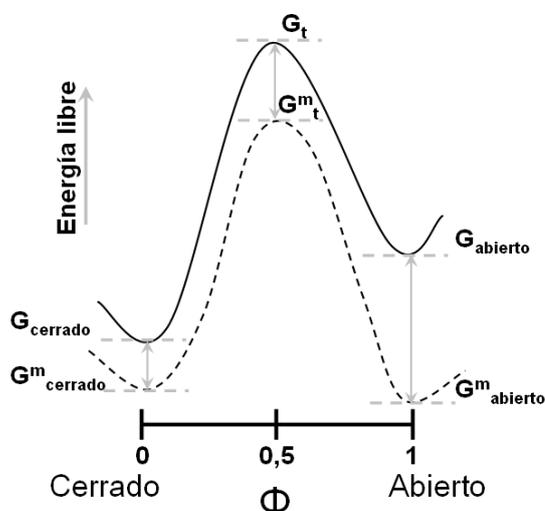


Figura 21: Diagrama de energía libre. Esquema teórico de un perfil energético que representa los cambios de energía durante el gatillado del canal del AChR salvaje (línea continua) y mutado "m" (línea de trazos) (Grosman C., 2002) □. El esquema ejemplifica un caso cuyo valor de Φ es cercano a 0,5.

Los estados en los que estos receptores (salvaje y mutado) pueden existir, y las energías asociadas a cada uno de ellos representados en la figura 19, pueden expresarse por medio de la siguiente ecuación:

$$(G_t^m - G_t) = \Phi(G_{abierto}^m - G_{abierto}) + (1 - \Phi)(G_{cerrado}^m - G_{cerrado}) \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde $(G_t^m - G_t)$, $(G_{abierto}^m - G_{abierto})$ y $(G_{cerrado}^m - G_{cerrado})$ corresponden a los ΔG luego de la perturbación (mutación = m) para los estados de transición, abierto y cerrado, respectivamente. Φ es una medida que indica cuán

semejante es el estado de transición al estado abierto (Cymes *et al.*, 2002; Grosman C., 2002; Mitra *et al.*, 2005).

Expresando la ecuación 5 en términos logarítmicos, se la puede convertir en la **ecuación lineal de Brønsted**, la cual relaciona constantes cinéticas que pueden ser determinadas experimentalmente:

$$\log\beta_2 = \Phi\log\theta_2 + \text{constante} \quad \text{Ecuación 6}$$

o

$$\log\alpha_2 = (1-\Phi)\log\theta_2 + \text{constante} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde β_2 , α_2 y θ_2 son las constantes de velocidad de apertura, cierre y gatillado del canal, respectivamente.

Por lo tanto, para "inferir" la estructura que adopta un residuo en particular de la molécula durante el gatillado, se realiza una serie de mutaciones puntuales en dicho sitio y se obtienen los valores cinéticos correspondientes. Utilizando los valores de las constantes β_2 y θ_2 se obtiene el gráfico de Brønsted, el cual se ajusta a la función lineal que relaciona ambas constantes (Ecuaciones 6 y 7) (Grosman *et al.*, 2000; Grosman y Auerbach, 2000b; Cymes *et al.*, 2002; Mitra *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005). A partir de dicho ajuste se obtiene el valor de la pendiente (Φ), la cual es una medida del grado de similitud entre el estado de transición y el estado abierto (cuanto mayor es su valor, más desplazado hacia la derecha se encuentra el perfil energético de la Figura 21). Φ puede tomar valores entre 0 y 1, donde 0 indica una conformación que asemeja al estado cerrado y 1 al estado abierto (Figura 21). Dicho análisis, a lo largo de distintos puntos de la proteína, da un indicio del orden en que se mueven sus distintos segmentos durante el gatillado del canal. Cuanto mayor es Φ para un residuo en particular, más temprano se mueve este durante el gatillado (Cymes *et al.*, 2002; Jha *et al.*, 2007; Auerbach A., 2007; Purohit y Auerbach, 2007; Purohit *et al.*, 2007).

CICLO DE DOBLE-MUTANTE.

Para identificar si dos residuos interactúan entre sí, utilizamos este análisis termodinámico basado en la incorporación de mutaciones en ambos sitios a evaluar (Carter *et al.*, 1984; Hidalgo y MacKinnon, 1995; Horovitz A., 1996).

Las constantes de gatillado (θ_2) obtenidas para los receptores de ACh salvaje y mutados se utilizaron para calcular el coeficiente de acoplamiento (Ω) a partir de la ecuación 8:

$$\Omega = \frac{\theta_2^{M1 M2} \theta_2^{M1* M2*}}{\theta_2^{M1* M2} \theta_2^{M1 M2*}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde M1* y M2* indican que los segmentos mutados para la subunidad α . La energía de acoplamiento fue calculada a partir del coeficiente Ω utilizando la ecuación 9:

$$\Delta\Delta G_{\text{acoplamiento}} = -RT \ln \Omega \quad \text{Ecuación 9}$$

Un valor de $\Delta\Delta G_{\text{acoplamiento}} > 0,5$ indica que ambos residuos están interactuando directamente.

MODELADO.

Para modelar la orientación de los residuos mutados en el receptor de ACh utilizamos la estructura del receptor de *torpedo* refinada a $\sim 4 \text{ \AA}$ (código de acceso: 2bg9) (Unwin N., 2005). Las mutaciones en las posiciones 11' de M2 y 15' de M1 fueron introducidas en este modelo mediante el programa O (Jones *et al.*, 1991). La geometría y la estructura final fueron refinadas utilizando los programas REFMAC y PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993; Murshudov *et al.*, 1997). Las figuras finales fueron preparadas con el programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

SIMULACIÓN.

Para el análisis del receptor 5-HT_{3A}, tanto las corrientes macroscópicas como registros de canal único fueron simulados utilizando el programa QuB (www.qub.buffalo.edu, Buffalo, NY) en base al modelo aceptado para

representar la activación en *bursts* y *clusters*, y utilizando las velocidades obtenidas del análisis cinético y los datos experimentales.

ESTADÍSTICA.

Los datos fueron comparados utilizando el test *t* de Student a dos colas para muestras apareadas, suponiendo varianzas iguales. El análisis se realizó mediante el programa GraphPad 5.

DROGAS.

Las drogas utilizadas fueron: Acetilcolina (Acetylcholine chloride, N°: A2661), colina (Choline chloride, N°: C7017), serotonina (Serotonin hydrochloride, N°: H9523), 2-metil-serotonina (2-Methylserotonin maleate salt, N°: M109), hidrocortisona. (Hydrocortisone, N°: H0888). Provistas por Sigma-Aldrich Argentina.

Capítulo 1

Capítulo I: Rol del segmento transmembranal M1 en el gatillado del receptor de acetilcolina.

Introducción.

RECEPTORES DE ACETILCOLINA.

Los receptores de acetilcolina (AChR) son proteínas integrales de membrana que responden a la unión de acetilcolina (ACh), la cual es sintetizada, almacenada y liberada por neuronas colinérgicas. Se clasifican según sus propiedades farmacológicas en dos grandes grupos: a) receptores nicotínicos (porque responden específicamente a nicotina), los cuales son receptores ionotrópicos debido a que conforman el canal por donde circulan iones (Changeux y Edelstein, 2001; Kalamida *et al.*, 2007); y b) receptores muscarínicos (metabotrópicos), los cuales responden específicamente a la acción de muscarina (Kalamida *et al.*, 2007).

RECEPTORES DE ACh METABOTRÓPICOS.

Estos receptores unen ACh y llevan a cabo la traducción de la señal a través de la interacción con proteínas G de membrana. Están presentes en distintos órganos y tejidos periféricos (corazón, músculo liso y glándulas exócrinas) y dentro del sistema nervioso central.

Hasta el momento, se han clonado cinco genes diferentes (m1-m5) que codifican para receptores muscarínicos (Felder C.C., 1995). Los receptores se agrupan en distintos tipos según el efecto final que producen: aquellos que provocan la movilización de Ca^{2+} intracelular (receptores m1, m2 y m5) o los que llevan a la inhibición de la adenilato ciclasa (m2 y m4). La función fisiológica final está determinada por el tipo de receptor que se estimule y por el mecanismo de transducción de la señal generada.

RECEPTORES DE ACh IONOTRÓPICOS.

Los receptores nicotínicos pertenecen a la familia de canales iónicos activados por ligando (LGIC). Estos receptores comparten una estructura pentamérica en la que pueden agruparse cinco subunidades iguales para

conformar receptores homopentaméricos, o subunidades homólogas, para dar receptores herteropentaméricos (ver Introducción). Según su ubicación, han sido clasificados en dos grandes grupos: **receptores neuronales**, expresados en tejidos del sistema nervioso central y periférico, y **receptores musculares**, expresados en la placa neuromuscular.

RECEPTOR NEURONAL DE ACh.

Los receptores nicotínicos neuronales están ampliamente expresados en el sistema nervioso, ganglios periféricos, ciertas áreas del cerebro y en células epiteliales y del sistema inmune (Marx *et al.*, 1990; Mihovilovic *et al.*, 1998; De Rosa *et al.*, 2005; Kawashima y Fujii, 2008). Hasta el momento se han clonado genes que codifican para nueve subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$). Las subunidades $\alpha 7$ - $\alpha 10$ pueden asociarse formando homopentámeros (es el caso de receptores $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$) o heteropentámeros (por combinaciones $\alpha 7/\alpha 8$ y $\alpha 9/\alpha 10$) (Plazas *et al.*, 2005). En cambio, las demás subunidades forman receptores heteropentaméricos con una estequiometría general $(\alpha x)_2(\beta y)_3$ (Kalamida *et al.*, 2007), aunque algunos autores han demostrado la expresión de complejos $(\alpha x)_3(\beta y)_2$ (Gotti *et al.*, 2007) (Figura I.1).

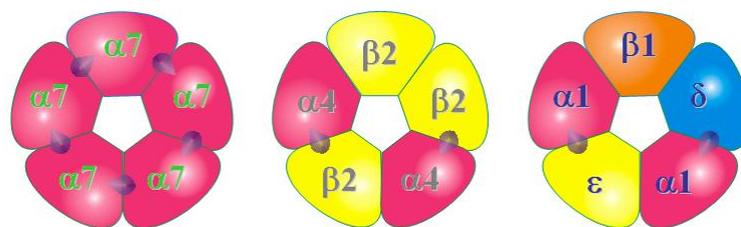


Figura I.1: Tipos de AChRs en mamífero. De izquierda a derecha: Receptores neuronales homopentamérico ($\alpha 7$) y heteropentamérico ($\alpha 4\beta 2$), y receptor de músculo adulto.

Los receptores neuronales de ACh se encuentran ampliamente distribuidos en cerebro, encontrándose tanto en zonas pre-, peri- y post-sinápticas (Lena *et al.*, 1999; Dickinson *et al.*, 2008). Aparentemente, su función principal sería moduladora y actuarían además, regulando la liberación de otros neurotransmisores, como dopamina, serotonina,

acetilcolina, glutamato y noradrenalina (Lena *et al.*, 1999; Champtiaux *et al.*, 2003; Wonnacott *et al.*, 2006; Dickinson *et al.*, 2008). Este control puede ser llevado a cabo gracias a su marcada permeabilidad al Ca^{2+} con una importante rectificación entrante (Adams y Nutter, 1992), lo cual da inicio a una cascada de señalización intracelular que lleva a un aumento sostenido de los niveles de Ca^{2+} . Esto lleva finalmente a la fusión de las vesículas de la membrana pre-sináptica y la posterior liberación de neurotransmisores. Por otra parte, el ingreso de Ca^{2+} originaría cascadas de señalización que tienen como efecto final la activación de factores de transcripción que gobiernan el metabolismo neuronal (Kihara *et al.*, 2001; Nakamizo *et al.*, 2005).

RECEPTOR MUSCULAR DE ACh.

En tejido de músculo fetal (previo a la innervación), en músculo adulto luego de la denervación, y en órgano eléctrico de *torpedo*, el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) posee una estequiometría $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ (Raftery *et al.*, 1980b). En cambio, en el nAChR de músculo adulto la subunidad γ es reemplazada por la subunidad ϵ , presentando una estequiometría $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ (Mishina *et al.*, 1986). El receptor fetal continúa expresándose en el adulto solo en timo y algunos músculos oculares del adulto (Missias *et al.*, 1996).

La función final del receptor es transducir la señal eléctrica que llega a través de la neurona motora al músculo esquelético para provocar la contracción muscular. Para ello, la membrana pre-sináptica libera ACh en la placa motora, la cual se une a los receptores presentes en la membrana post-sináptica, provocando la apertura de los canales con el consiguiente ingreso de iones Na^+ , produciendo la despolarización de la membrana de la célula muscular lo que provoca la apertura de canales de Ca^{2+} que generan la contracción muscular.

La estructura del receptor ha sido motivo de varios estudios a lo largo de muchos años en los que se demostró que el segmento M2 de cada subunidad determina las paredes del poro (ver Introducción). Este segmento contiene los residuos que constituyen el filtro de selectividad y la compuerta del canal. Si bien los demás segmentos no participarían directamente en la constitución del poro, su importancia para el correcto

funcionamiento del receptor ha sido demostrada por un gran número de estudios. Se conoce que una única mutación puntual en el segmento M1 de la subunidad α o ε es suficiente para provocar un síndrome miasténico congénito (Wang *et al.*, 1997; Hatton *et al.*, 2003). Por otro lado, estudios de mutagénesis dirigida realizados sobre residuos de los segmentos transmembranales del receptor afectaron tanto su expresión como su correcta activación, confirmando de esta manera la intervención de todos los segmentos transmembranales en el funcionamiento del receptor (Lo *et al.*, 1991; Sine *et al.*, 1995; Akabas y Karlin, 1995; Engel *et al.*, 1996a; Bouzat *et al.*, 1998; Bouzat *et al.*, 2000; De Rosa *et al.*, 2002; Bouzat *et al.*, 2002; Spitzmaul *et al.*, 2004; De Rosa *et al.*, 2008).

Objetivos.

Basándonos en resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, donde demostramos la participación del residuo 15' de la subunidad β del AChR muscular en el gatillado del canal (Spitzmaul *et al.*, 2004), e impulsados por el modelo estructural del receptor publicado en 2003, el cual sugiere que los segmentos transmembranales M1 y M2 del receptor nicotínico de torpedo estarían interactuando entre sí a través de residuos específicos (Miyazawa *et al.*, 2003), nuestros objetivos descriptos en el presente capítulo fueron:

- 1) Demostrar la intervención de los residuos 15' de M1 de las subunidades α , ϵ y δ en el gatillado del canal.
- 2) Identificar la relación entre las características físico-químicas del residuo en 15' de M1 y su contribución al funcionamiento del receptor.
- 3) Demostrar experimentalmente la interacción entre los residuos 15' del segmento M1 y 11' de M2 de la subunidad α del receptor.

Desarrollo y Resultados.

I.1) ROL FUNCIONAL DEL RESIDUO 15' EN LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR.

De la inspección visual de las secuencias de aminoácidos de los segmentos transmembranales M1 para distintas subunidades del AChR muscular adulto se observa un patrón de conservación particular para el residuo 15'. Este residuo es fenilalanina (F) para las subunidades α e isoleusina (I) para las no- α (Figura I.2). Previamente, demostramos que mutaciones en la posición 15' de M1 de la subunidad β alteran de manera significativa la cinética de gatillado del receptor (Spitzmaul *et al.*, 2004).

		M1															
		5'									15'					20'	
α 1	ratón	I	V	N	V	I	I	P	C	L	L	F	S	F	L	T	G
α 1	humano	I	V	N	V	I	I	P	C	L	L	F	S	F	L	T	G
α 1	torpedo	V	V	N	V	I	I	P	C	L	L	F	S	F	L	T	G
β 1	ratón	L	V	N	V	I	A	P	C	I	L	I	T	L	L	A	I
β 1	humano	L	V	N	V	I	A	P	C	I	L	I	T	L	L	A	I
β 1	torpedo	I	V	Y	T	I	I	P	C	I	L	I	S	I	L	A	I
ϵ	ratón	V	I	N	I	I	V	P	C	V	L	I	S	G	L	V	L
δ	ratón	I	I	N	I	L	V	P	C	V	L	I	S	F	M	I	N
γ	ratón	V	I	N	I	I	A	P	C	V	L	I	S	S	V	A	I

Figura I.2: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos para el segmento transmembranal M1 de distintas subunidades del AChR de distintas especies.

Para evaluar la importancia de esta conservación en las subunidades α , ϵ y δ , e identificar alguna relación entre la estructura del residuo y el funcionamiento del receptor, mutamos los residuos 15' de M1 de dichas subunidades a distintos aminoácidos hidrofóbicos. Como notación indicamos la subunidad sobre la que se realizó dicha mutación, luego el residuo presente en el receptor salvaje, seguido por su posición relativa dentro del segmento M1, y finalmente, el aminoácido al cual fue mutado. Por ejemplo, el cambio de la fenilalanina encontrada en la posición 15' de M1 de la subunidad α por alanina, se denominó " α F15'A".

Por medio de la técnica de *patch-clamp* obtuvimos registros de canal único de los receptores salvajes y mutantes a distintas concentraciones de

acetilcolina. Para las mutaciones que mostraron un importante aumento en la constante de gatillado del canal (θ_2), realizamos también registros a 20 mM de colina, un agonista parcial del AChR, con el fin de detectar un aumento de la velocidad de apertura del canal (β_2), lo cual no podría ser resuelto utilizando ACh como agonista (ver Metodología) debido a que β_2 se encuentra cercana al límite de resolución del equipo de *patch-clamp*.

I.1.1) Mutaciones en la posición 15' de M1.

Inicialmente evaluamos el efecto provocado por las mutaciones en las que intercambiamos el residuo presente en la subunidad α (F) por el equivalente en las no- α (I), y viceversa. A partir del AChR expresando dicha subunidad obtuvimos registros de canal único a 30 μ M de ACh, la cual es una concentración cercana al EC_{50} del receptor salvaje (Bouzat *et al.*, 2000). Paralelamente, mutamos el residuo 15' de todas las subunidades a alanina (A), el aminoácido hidrofóbico más simple. Como se observa en la figura, todas las mutaciones provocaron cambios en el gatillado del canal (Figura I.3). Las mutaciones en α generaron un aumento en la P_{apertura} del receptor. En cambio, las mutaciones en ϵ y δ llevaron a un leve aumento o disminución de la P_{apertura} (Figura I.3, Tabla I.1).

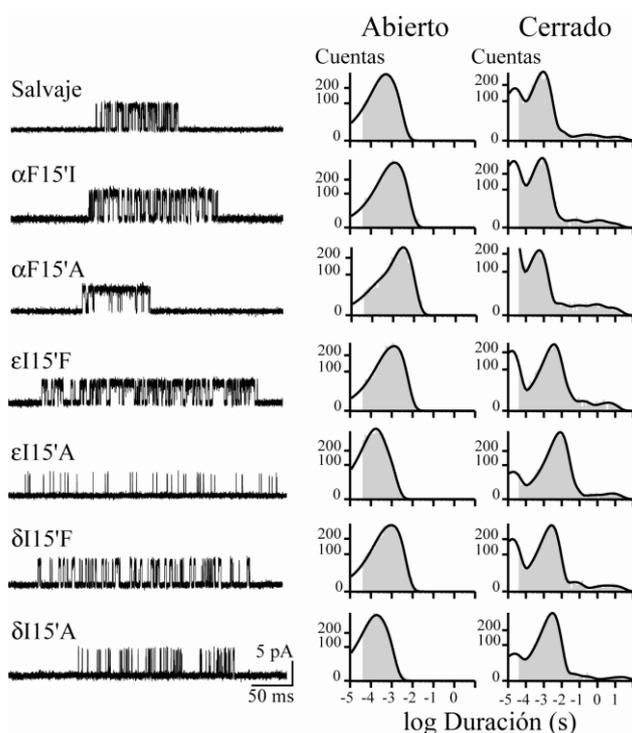


Figura I.3: Efecto de las mutaciones en 15' de M1 de las distintas subunidades.

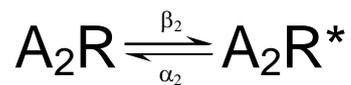
Izquierda: Registros de canal único del receptor salvaje y mutantes activados por 30 μ M de ACh. *Derecha:* Histogramas de estados abierto y cerrado para los receptores indicados. Filtro 10 kHz, potencial de membrana -70 mV.

AChR	$\tau_{abierto}$ (ms)	$\tau_{cerrado}$ (ms)	$P_{apertura}$	n
Salvaje	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,4	0,43 ± 0,09	7
$\alpha F15'I$	1,8 ± 0,4	0,90 ± 0,04	0,60 ± 0,09	4
$\alpha F15'A$	3,0 ± 0,4	0,5 ± 0,1	0,89 ± 0,02	5
$\alpha F15'V$	3,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,88 ± 0,03	3
$\alpha F15'L$	4,3 ± 0,4	0,30 ± 0,04	0,94 ± 0,02	6
$\alpha F15'Y$	1,0 ± 0,3	2,1 ± 0,3	0,30 ± 0,05	6
$\alpha F15'G$	6,6 ± 0,4	0,20 ± 0,05	0,98 ± 0,01	5
$\alpha F15'W$	7,6 ± 0,8	0,011 ± 0,001	0,99 ± 0,01	3
$\epsilon F15'F$	1,8 ± 0,3	2,5 ± 0,9	0,60 ± 0,03	6
$\epsilon F15'A$	0,3 ± 0,1	6,8 ± 1,5	0,03 ± 0,01	9
$\epsilon F15'Y$	2,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,90 ± 0,01	4
$\delta F15'F$	1,6 ± 0,2	3,1 ± 0,7	0,40 ± 0,09	4
$\delta F15'A$	0,45 ± 0,09	3,0 ± 1,0	0,10 ± 0,04	8
$\delta F15'Y$	1,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,80 ± 0,02	4

Tabla I.1: Constantes cinéticas obtenidas para los distintos receptores conteniendo la mutación en M1 indicada.

Los tiempos de estado abierto ($\tau_{abierto}$) y cerrado ($\tau_{cerrado}$) se obtuvieron a partir de sus correspondientes histogramas. Los datos corresponden a la media \pm desvío estándar.

Este aumento en la $P_{apertura}$ podría estar indicando un aumento en la constante de apertura β_2 , llevándola a un valor superior al límite de resolución del equipo de *patch-clamp* utilizado. Esto llevaría a la pérdida de eventos de cierre dentro del *cluster* produciendo una sobreestimación del tiempo de estado abierto del canal. Por ello utilizamos colina, un agonista parcial del AChR, que produce la apertura del canal con una velocidad unas 600 veces más lenta que con ACh (Grosman y Auerbach, 2000a). De esta manera, es posible estudiar mutaciones que aumentan dicha velocidad. Utilizamos colina 20 mM, una concentración saturante que hace despreciables los pasos de asociación para la apertura del receptor, y permite entonces utilizar un esquema simple de activación compuesto por el receptor biligado cerrado y biligado abierto (Esquema I.1).



Esquema I.1

A esta concentración de colina se observó un bloqueo rápido del poro del receptor, el cual se evidenció por una disminución en la conductancia del canal, con eventos de apertura de aproximadamente un 60% de amplitud respecto de la observada a bajas concentraciones de colina. En todos los casos los receptores se activaron en forma de *clusters* mostrando un único componente tanto para los histogramas de cierre y como para los de apertura. Las curvas teóricas obtenidas del esquema I.1 ajustaron correctamente los histogramas experimentales, confirmando que este esquema representa el proceso de activación del receptor salvaje, como así también, de los receptores mutados.

El tiempo de estado abierto mostró importantes cambios en todas las mutaciones, con una diferencia de ~12 veces entre el más breve y el más prolongado (Figura I.4, Tabla I.2). El tiempo de estado cerrado disminuyó en todas las mutaciones realizadas en α M1 excepto en la que se reemplazó el residuo F por Y (tirosina). El rango de variación entre el tiempo de apertura más breve y el más prolongado fue de ~500 veces (Figura I.4, Tabla I.2). Todas las mutaciones en 15' de α M1 provocaron un aumento en la P_{apertura} del canal, excepto α F15'Y (Tabla I.2).

Los cambios observados en la constante de gatillado θ_2 mostraron un amplio rango de valores. Algunas mutaciones provocaron una disminución, otras un leve aumento (~1,4 veces) y otros un aumento marcado (~790 veces) en el valor de θ_2 . En general, el rango de variación fue de ~1.900 veces entre el menor y el mayor valor de θ_2 obtenido (Tabla I.2). En las subunidades ε y δ , la mutación a Y provocó un aumento de θ_2 , mientras que la mutación a A llevó a una importante disminución en el valor de dicha constante (Tabla I.2).

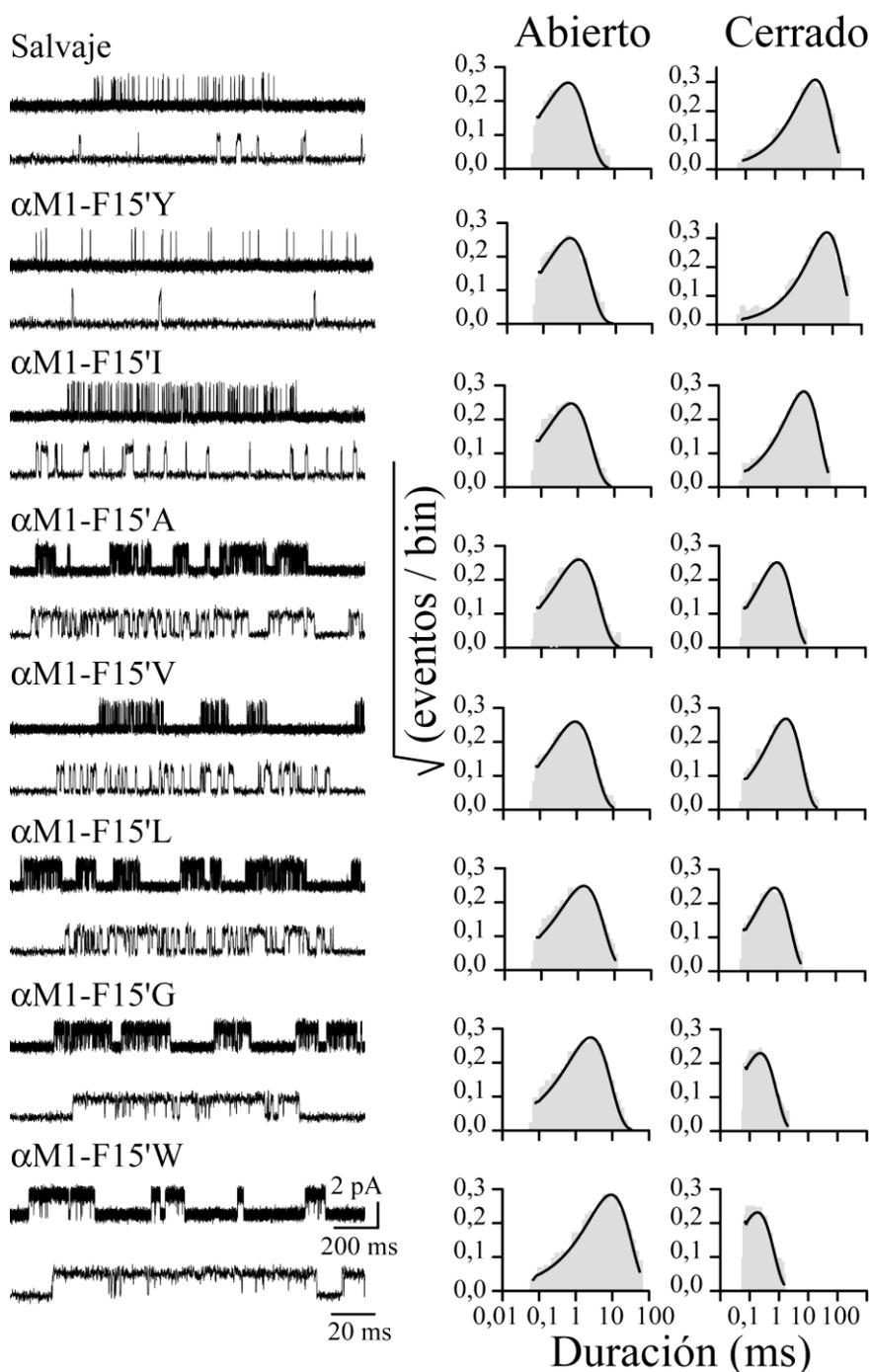


Figura I.4: Registros de canal único obtenidos a partir de receptores activados por 20 mM de colina.

Izquierda: Registros obtenidos a partir del receptor salvaje y mutados en 15' de M1 de la subunidad α . Los *clusters* obtenidos se muestran a dos escalas temporales. *Derecha:* Histogramas de cierre y apertura para los distintos receptores ajustados al esquema 1 (ver Metodología). Filtro 5 kHz, potencial de membrana -70 mV.

AChR	$\tau_{abierto}$ (ms)	$\tau_{cerrado}$ (ms)	$P_{apertura}$	β_2 (s ⁻¹)	α_2 (s ⁻¹)	θ_2 (s ⁻¹)
Salvaje	0,5 ± 0,1	12 ± 5	0,04 ± 0,01	90 ± 20	2.050 ± 400	0,04 ± 0,01
α F15'I	0,7 ± 0,2	7,0 ± 1,6	0,08 ± 0,02	145 ± 30	1.630 ± 360	0,09 ± 0,02
α F15'A	1,2 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,60 ± 0,04	1.320 ± 140	910 ± 170	1,5 ± 0,2
α F15'V	1,0 ± 0,3	1,7 ± 0,4	0,40 ± 0,06	590 ± 160	1.080 ± 340	0,6 ± 0,2
α F15'L	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,55 ± 0,07	1.450 ± 160	1.110 ± 290	1,4 ± 0,4
α F15'Y	0,7 ± 0,2	52 ± 18	0,015 ± 0,004	20 ± 7	1.450 ± 420	0,016 ± 0,004
α F15'G	1,9 ± 0,4	0,20 ± 0,02	0,90 ± 0,02	4.240 ± 770	670 ± 160	6,5 ± 1,3
α F15'W	6,3 ± 1,5	0,10 ± 0,04	1.00 ± 0,01	4.700 ± 1140	175 ± 45	27 ± 6
ϵ F15'F	1,6 ± 0,7	18 ± 7	0,050 ± 0,004	55 ± 15	970 ± 95	0,06 ± 0,01
ϵ F15'A	0,20 ± 0,04	38 ± 8	0,005 ± 0,001	25 ± 2	4.910 ± 740	0,005 ± 0,001
ϵ F15'Y	1,2 ± 0,3	2,7 ± 0,7	0,32 ± 0,04	410 ± 120	840 ± 185	0,5 ± 0,09
δ F15'F	0,9 ± 0,3	19 ± 4	0,06 ± 0,03	70 ± 15	1.250 ± 450	0,06 ± 0,03
δ F15'A	0,30 ± 0,07	41 ± 13	0,010 ± 0,003	40 ± 6	3.830 ± 1130	0,01 ± 0,004
δ F15'Y	0,50 ± 0,06	3,4 ± 0,3	0,12 ± 0,02	320 ± 30	2.330 ± 460	0,14 ± 0,03

Tabla I.2: Parámetros cinéticos de receptores salvaje y mutados en 15' de M1. Tiempos de estado abierto ($\tau_{abierto}$) y cerrado ($\tau_{cerrado}$) obtenidos a partir de registros activados por 20 mM de colina. Los datos corresponden a la media \pm desvío estándar de al menos tres registros.

I.1.2) Bases estructurales de los cambios cinéticos asociados a las mutaciones en M1.

Para estudiar la relación estructura-función del residuo en 15' de M1 relacionamos los valores de la constante cinética θ_2 con la hidrofobicidad o el volumen del aminoácido presente en dicha posición para las distintas subunidades. Los resultados mostraron una correlación directa entre θ_2 y el volumen del aminoácido en 15' de M1 (Figura I.5). Para la subunidad α se observó una relación inversamente proporcional entre dichas variables, es decir, cuanto mayor es el volumen del residuo, más bajo es el valor de θ_2 . Una excepción fue el caso de la mutación F15'W, ya que el receptor mostró la máxima activación a pesar de tratarse del aminoácido de mayor volumen.

Para las subunidades ϵ o δ , θ_2 mostró también una relación lineal con el volumen del aminoácido presente en 15' de M1. Sin embargo, la relación fue opuesta a la observada en la subunidad α (Figura I.5); es decir, el

aumento del volumen del residuo en 15' de M1 se acompaña de un aumento en el valor de θ_2 del receptor.

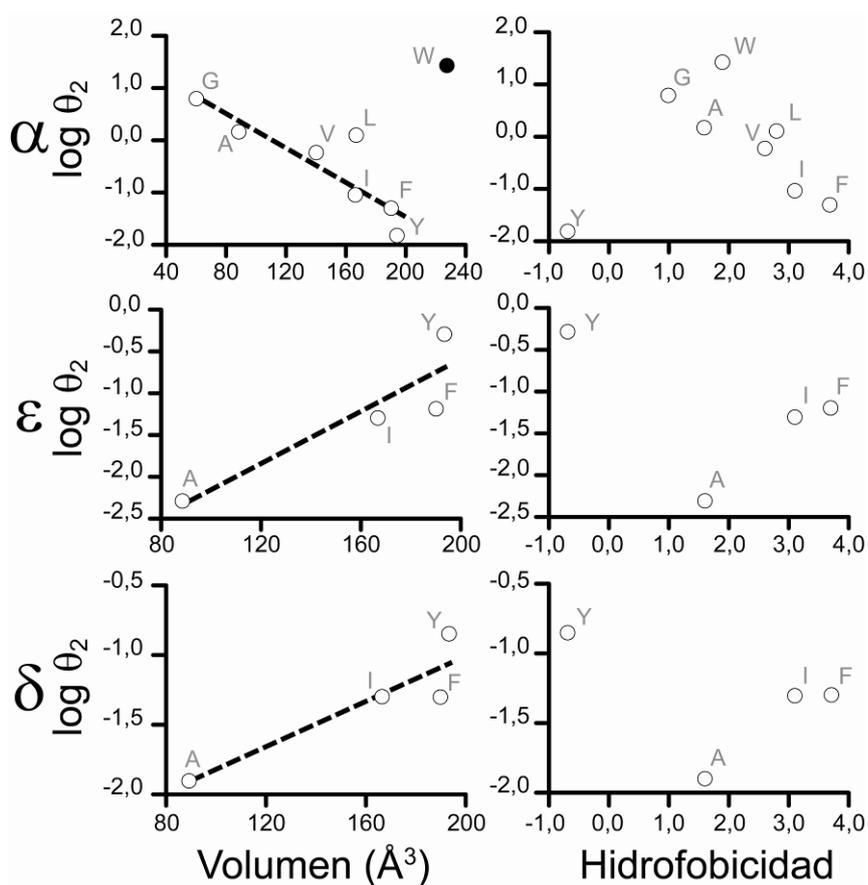


Figura I.5: Cambios en la cinética del receptor en función de las propiedades del aminoácido introducido. Relación entre la constante de gatillado θ_2 para cada receptor y el volumen e hidrofobicidad del aminoácido presente en 15' de M1 de las distintas subunidades. Hidrofobicidad de los aminoácidos: los valores corresponden a la escala de Goldman, Engelman y Steitz (Engelman *et al.*, 1986).

I.1.3) Análisis de energía libre en el equilibrio durante el gatillado (REFER).

Para inferir la estructura del receptor en la región cercana al residuo 15' del segmento transmembranal M1 durante el gatillado utilizamos el análisis termodinámico que relaciona los cambios de energía libre del receptor durante la transición entre los estados abierto y cerrado (REFER) (ver Metodología) (Grosman *et al.*, 2000; Cymes *et al.*, 2002; Grosman C., 2002; Mitra *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005). Utilizando los valores de las

constantes β_2 y θ_2 se obtiene el gráfico de Brønsted, el cual se ajusta a una función lineal que relaciona ambas constantes (Ecuación 6, Metodología).

A partir de dicho ajuste se obtiene el valor de la pendiente (Φ), la cual puede tomar valores entre 0 y 1, donde 0 indica una conformación que asemeja al estado cerrado y 1, al estado abierto (Figura I.6). Dicho análisis, a lo largo de distintos puntos de la proteína, da un indicio de cómo se transmite el movimiento desde el sitio de unión del ligando hasta la compuerta del canal, siendo el valor de Φ cercano a 1 para los residuos que se mueven inicialmente, y cercanos a 0 los que se mueven más tarde en el proceso de gatillado (Grosman C., 2002; Auerbach A., 2007).

Los valores obtenidos para el residuo 15' de todas las subunidades evaluadas fue $\sim 0,7$ (Figura I.6), indicando que la estructura en el estado de transición para estas posiciones tiene una similitud de $\sim 70\%$ con el estado abierto (Grosman C., 2002; Spitzmaul *et al.*, 2004), es decir, estos residuos se mueven temprano durante el gatillado del canal.

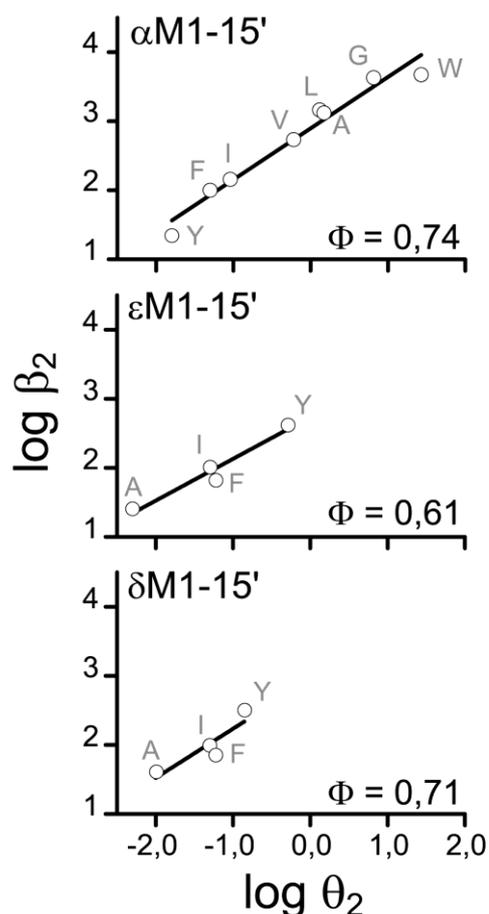


Figura I.6: Gráfico de Brønsted para los residuos 15' de M1. Para cada curva los puntos corresponden a las constantes β_2 y θ_2 obtenidas para cada mutación. Del ajuste lineal se obtuvo el correspondiente valor de Φ (ver Metodología).

I.2) INTERACCIÓN ENTRE M1 Y M2 DE LA SUBUNIDAD ALFA.

Estudios de la estructura del AChR sugirieron que los segmentos transmembranales M1, M3 y M4 se encontrarían por detrás del segmento M2 con algunos sitios de contacto directo entre ellos. La estructura molecular a baja resolución mostró una posible interacción entre los residuos 15' de M1 y 11' de M2 (Miyazawa *et al.*, 2003).

Para evaluar si existe una interacción directa entre estos dos residuos utilizamos el análisis termodinámico de doble-mutantes usando las constantes de gatillado (θ_2) obtenidas para cada receptor (Carter *et al.*, 1984; Hidalgo y MacKinnon, 1995; MacKinnon R., 1995). Para realizar dicho análisis construimos las siguientes subunidades mutadas: α M1-F15'L y α M2-L15'F (simple-mutantes), y α M1-F15'L/ α M2-L15'F (doble-mutante), y estudiamos la cinética de activación de dichos receptores. Como vimos en el punto I.1.1, la mutación α M1-F15'L produce un aumento en la velocidad de activación β_2 , por lo que estudiamos la cinética de todas estas mutaciones activando con 20 mM de colina.

I.2.1) Mutaciones en 15' de M1 y 11' de M2 de la subunidad α .

Aunque el residuo L11' de M2 de la subunidad α no se encuentra orientado hacia el poro del canal, descartamos inicialmente la posibilidad de que la mutación L11'F pudiera afectar el bloqueo provocado por colina en altas concentraciones, lo que llevaría a resultados erróneos. Para ello determinamos la amplitud de los receptores conteniendo la mutación en M2 activados a baja (100 μ M) y alta (20 mM) concentración de colina. Las amplitudes de los eventos de canal único obtenidos a 100 μ M y 20 mM de colina a -70 mV de potencial de membrana fueron de $5,50 \pm 0,11$ y $2,15 \pm 0,04$ pA para el receptor salvaje; $5,31 \pm 0,10$ y $2,12 \pm 0,10$ pA para el simple-mutante α M2-L11'F; y $5,27 \pm 0,15$ y $2,11 \pm 0,07$ pA para la doble-mutante. De esta manera confirmamos que el bloqueo por colina 20 mM en el receptor conteniendo la mutación en M2 es similar al del receptor salvaje (Figura I.7).

Todos los AChRs se activaron formando *clusters* y se observaron cambios cinéticos dramáticos para las simple-mutantes de M1 y M2. Los cambios más significativos ocurrieron en el tiempo de estado cerrado, donde observamos una disminución de ~17 veces para α M1-F15'L y un aumento de ~10 veces para α M2-L11'F (Figura I.7, Tabla I.3). En cambio, la doble-mutante mostró un tiempo de cierre similar al del receptor salvaje.

El análisis cinético de los *clusters* mostró que la velocidad de apertura β_2 aumentó ~15 veces en la mutante M1, disminuyó ~10 veces en la mutante M2 y fue similar a la del receptor salvaje para la doble-mutante (Tabla I.3). Esto demuestra que la mutación α M1-F15'L facilita el gatillado del canal ($\theta_2^{M1^*M2} \gg \theta_2^{M1M2}$), en cambio la mutación α M2-L11'F lo desfavorece ($\theta_2^{M1M2^*} \ll \theta_2^{M1M2}$) (Tabla I.3). Al restaurar el par de aminoácidos del receptor salvaje pero en posiciones intercambiadas (doble-mutante), el receptor presentó una cinética similar al salvaje ($\theta_2^{M1^*M2^*} \approx \theta_2^{M1M2}$) (Figura I.6, Tabla I.3).

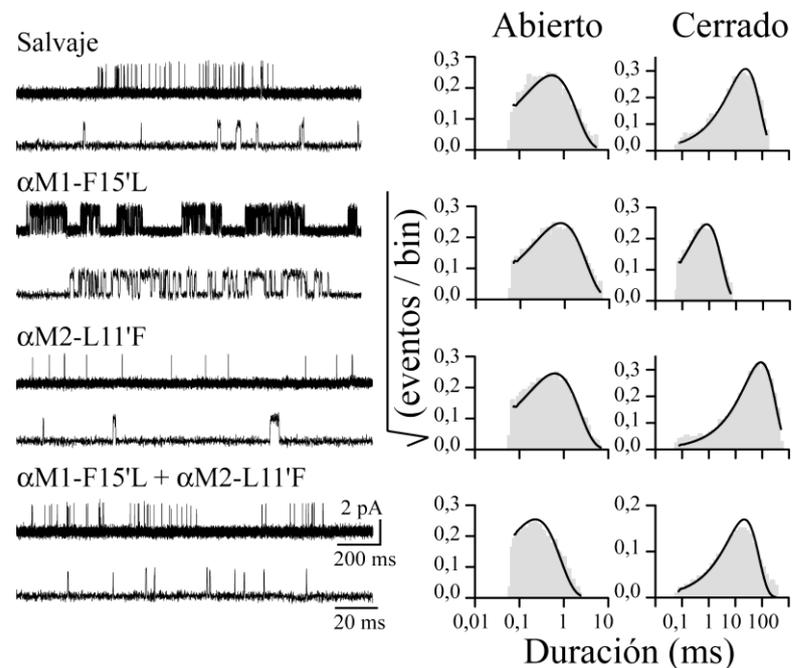


Figura I.7: Mutaciones en 15' de M1 y 11' de M2.

Izquierda: Registros de canal único obtenidos de los receptores indicados activados por 20 mM de colina. Los trazos muestran *clusters* para cada receptor a dos escalas temporales. *Derecha:* Histogramas de estados abierto y cerrado para cada receptor. Cada histograma fue ajustado a la curva teórica obtenida en base al esquema 1 (ver Metodología).

Filtro 5 kHz, potencial de membrana -70 mV.

I.2.2) Análisis de doble mutante.

Para evaluar el grado de interacción entre ambos residuos, calculamos los cambios de energía libre (ΔG) en base a la constante de equilibrio de gatillado del canal (θ_2) debido a las mutaciones introducidas. La mutación $\alpha M1-F15'L$ llevó a una disminución de ΔG ($\Delta G = -1,9$ kcal / mol). En cambio la mutación $\alpha M2-L11'F$ provocó un aumento de dicho valor ($\Delta G = 1,4$ kcal / mol). El valor de ΔG hallado para la doble-mutante ($\Delta G = 0,7$ kcal / mol) fue significativamente diferente del correspondiente a la suma de los cambios de energía producidos por las mutaciones individuales. Esto indica que los efectos provocados por las mutaciones no son independientes y que los residuos están acoplados en su contribución al gatillado del canal (Schreiber y Fersht, 1995; Sine y Engel, 2006).

Para confirmar la interacción entre ambos residuos, calculamos los valores de ΔG de acoplamiento en base al planteo de un ciclo termodinámico que relaciona cada receptor y sus correspondientes ΔG (Figura I.8). Utilizando los valores de θ_2 de cada receptor obtuvimos la constante de acoplamiento Ω (ver Metodología), a partir de la cual calculamos la energía libre de acoplamiento ($\Delta\Delta G$), cuyo valor fue de $-1,2$ kcal / mol (Figura I.8). Un valor de $\Delta\Delta G$ distinto de 0 indica que existe interacción entre los residuos, y por lo tanto, este análisis reveló que los residuos 15' de M1 y 11' de M2 de la subunidad α interactúan entre sí.

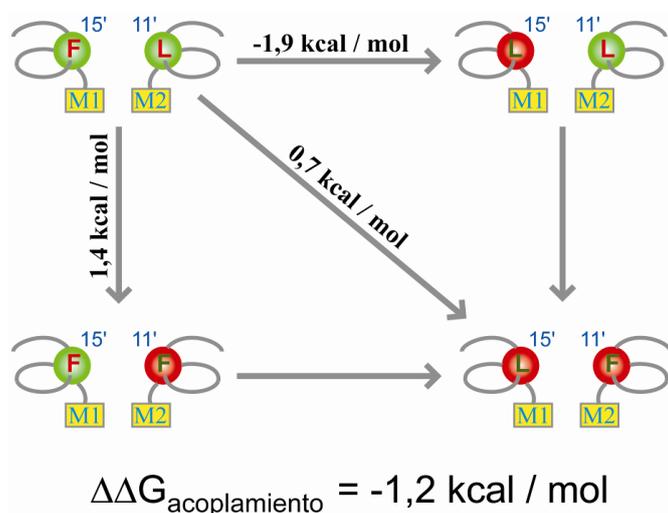


Figura I.8: Ciclo de doble mutante.

Mutaciones individuales y simultáneas realizadas en 15' de M1 y 11' de M2 de la subunidad α para evaluar su interacción. El valor del cambio de energía de acoplamiento fue obtenido a partir de la ecuación 9 (ver Metodología).

I.2.3) Confirmación del valor de θ_2 obtenido para el receptor mutado en 11' de M2.

En vista de que la mutación L11'F en α M2 disminuyó la P_{apertura} del receptor de forma muy marcada, los registros obtenidos con colina 20 mM mostraron canales separados por tiempos de cierre muy prolongados, lo que no permitió distinguir claramente los *clusters*. Es decir, al estar los eventos de apertura pertenecientes a un *cluster* separados por un tiempo de cierre muy prolongado, podría suceder que coincidan en el tiempo de activación más de una molécula de receptor, llevando a la superposición de más de un *cluster* en el registro. Esto llevaría a observar *clusters* con distinta P_{apertura} dentro de un mismo registro, haciendo que la medición de sus tiempos de cierre y apertura fueran inexactos, afectando de esta manera el análisis cinético.

Para resolver este inconveniente, utilizamos las siguientes estrategias:

a) Disminución de la expresión de receptores:

Para ello utilizamos un protocolo de transfección de un día (ver Metodología), donde luego de 6 hs de dejar el precipitado en contacto con las células, este fue removido y obtuvimos los registros de *patch-clamp* inmediatamente.

b) Bloqueo de los receptores presentes en el sello:

En este caso utilizamos α -bungarotoxina (antagonista competitivo del receptor), la cual fue agregada junto con la solución de colina dentro de la pipeta. De esta manera disminuyó el número de receptores dentro del sello capaces de responder al agonista, logrando así disminuir el número de eventos en el registro.

Por medio de estas estrategias obtuvimos registros con un muy bajo número de eventos, lo que nos permitió identificar claramente los *clusters* para esta mutación. Dichos *clusters* mostraron activaciones breves separadas por tiempos de cierre prolongados (Figura I.7, Tabla I.3), a

partir de los cuales, en base al análisis cinético, pudimos definir que fue debido a una disminución en la velocidad de apertura β_2 (Tabla I.3).

c) Utilización de un AChR mutante con ganancia de función:

Para corroborar esta disminución en el valor de β_2 provocado por la mutación en M2, introdujimos la mutación ϵ L269F que provoca un aumento en la velocidad de apertura del receptor, la cual llamaremos mutación *background* (bg). Esta mutación aumenta la P_{apertura} del receptor muscular y fue caracterizada como responsable de un síndrome miasténico congénito (Engel *et al.*, 1996b). En presencia de 20 mM de colina, el receptor conteniendo la mutación bg se activa en *clusters* bien definidos, conformados por aperturas más prolongadas y tiempos de cierre más breves respecto del receptor salvaje (Figura I.7 y I.9, Tabla I.3). La disminución debida al bloqueo rápido provocado por colina en altas concentraciones fue similar a la del receptor salvaje, siendo la amplitud del canal de $2,10 \pm 0,08$ pA. Por lo tanto, la mutación bg no afecta el bloqueo del receptor. Como se ve en la figura I.9, la combinación de la mutación bg con L11'F llevó a la obtención de *clusters* claramente distinguibles, lo que permitió un análisis cinético más exacto.

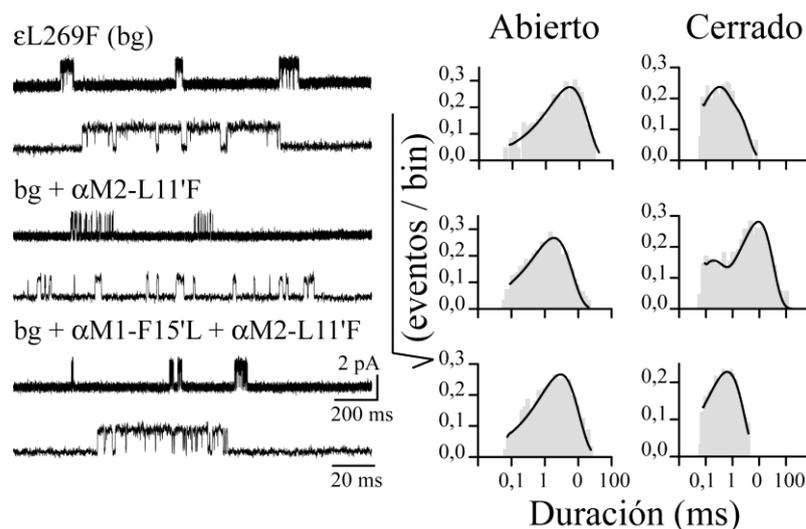


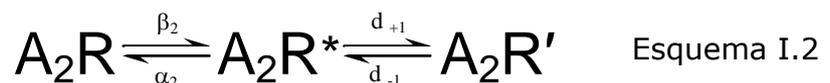
Figura I.9: Registros de canal único del AChR conteniendo la mutación inicial (*background*) ϵ L269F.

Izquierda: Registros de canal único mostrando *clusters* obtenidos a 20 mM de colina a partir de receptores conteniendo las mutaciones indicadas. *Derecha:* Histogramas de cierre y apertura para cada receptor ajustados a la ecuación 1 (ver Metodología).

(bg): mutación *background*.

Filtro 5 kHz, potencial de membrana -70 mV.

Llamativamente, en todos los registros obtenidos a partir de receptores conteniendo la mutación bg se observaron dos componentes de estado cerrado (Figura I.9). Dicho cierre fue observado para otras mutaciones realizadas sobre el AChR, y ha sido propuesto como un estado desensibilizado breve al cual llega el receptor a partir del estado abierto (Mitra *et al.*, 2005). Por lo tanto, realizamos el análisis cinético de los receptores conteniendo la mutación bg en base al siguiente esquema:



A partir de dicho análisis cinético confirmamos que la mutación bg aumenta la velocidad de apertura β_2 y disminuye la velocidad de cierre α_2 (Tabla I.3). Los valores obtenidos para los receptores conteniendo la mutación combinada bg+ α M2-L11'F mostraron una disminución de ~8 veces en la velocidad β_2 respecto del receptor que solo contenía la mutación bg (Tabla I.3, panel inferior). Esta disminución fue similar a la observada entre el receptor salvaje y aquel conteniendo la mutación α M2-L11'F (~10 veces) (Tabla I.3, panel superior).

AChR	τ_{abierto} (ms)	τ_{cerrado} (ms)	P_{apertura}	β_2 (s ⁻¹)	α_2 (s ⁻¹)	θ_2 (s ⁻¹)
Salvaje	0,5 ± 0,1	12 ± 5	0,04 ± 0,01	90	2.050	0,04
α M1-F15'L	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,55 ± 0,07	1.445	1.110	1,4
α M2-L15'F	0,5 ± 0,1	122 ± 17	0,005 ± 0,001	10	2.130	0,005
α M1-F15'L + α M2-L15'F	0,3 ± 0,1	14 ± 3	0,02 ± 0,01	80	4.930	0,02
ϵ L269F (bg)	2,3 ± 0,8	0,8 ± 0,3	0,86 ± 0,03	1.030	150	6,9
bg + α M2-L15'F	1,7 ± 0,4	8,1 ± 0,3	0,21 ± 0,04	130	440	0,3
bg + α M1-F15'L + α M2-L15'F	2,2 ± 0,4	0,8 ± 0,1	0,78 ± 0,02	1.460	350	4,2

Tabla I.3: Parámetros cinéticos de receptores activados con colina 20 mM.

Los tiempos de estado abierto (τ_{abierto}) y cerrado (τ_{cerrado}) se obtuvieron a partir de sus correspondientes histogramas. Los datos corresponden a la media ± desvío estándar de al menos tres registros. Las constantes cinéticas se obtuvieron a través del ajuste de los histogramas experimentales al esquema I.1. Para los receptores conteniendo la mutación ϵ L269F (bg) el análisis cinético se realizó en base el esquema I.2.

bg: *background* (ϵ L269F)

De esta manera, el uso de una mutación adicional que aumenta la P_{apertura} permitió confirmar el cambio en la velocidad β_2 provocado por la mutación en L11' de M2.

d) Estudio del receptor mutado en α M2-L11'F activado por ACh:

También realizamos el análisis cinético para los receptores salvaje y mutado en α M2-L11'F activando con ACh en un rango de concentración entre 100-1000 μ M. Los registros obtenidos ajustaron correctamente con el esquema clásico de activación del AChR (ver Introducción) (Bouzat *et al.*, 2000). El análisis cinético mostró una disminución de ~ 7 veces del valor de β_2 para el receptor mutado en M2, siendo de 50.000 s^{-1} para el receptor salvaje (Salamone *et al.*, 1999; Bouzat *et al.*, 2000) y $7.000 \pm 300 \text{ s}^{-1}$ para el receptor mutado. Una vez más, confirmamos que la disminución de β_2 obtenida para el receptor conteniendo la mutación α M2-L11'F activado con colina 20 mM representa correctamente la velocidad de apertura para dicho receptor (Tabla I.3).

Para el receptor conteniendo la doble mutación $\text{bg}+\alpha$ M1-F15'L no fue posible realizar el análisis cinético debido a que la mutación bg aumenta la velocidad β_2 de manera tal que supera la capacidad de resolución del equipo de *patch-clamp*. El análisis realizado para la doble-mutante conteniendo además la mutación bg confirmó también que al restituir el par F-L se restablece el comportamiento del receptor salvaje (Figura I.9; Tabla I.3). Las velocidades de cierre y apertura a partir del estado A_2R' (d_{+1} y d_{-1}) (Esquema I.2) fueron similares para todas las mutaciones portando la mutación bg ($d_{+1} \approx 150 \text{ s}^{-1}$ y $d_{-1} \approx 5.000 \text{ s}^{-1}$). Por otro lado, el efecto provocado por la mutación bg no interfirió en el cambio generado por la mutación α M2-L11'F. Esto fue confirmado al comprobar que el cambio de energía libre (ΔG) de la mutante $\text{bg}+\alpha$ M2-L11'F no fue significativamente distinto del valor obtenido de la suma de ΔG de los receptores bg y α M2-L11'F mutados individualmente.

Discusión.

El análisis de las secuencias de los residuos que conforman el segmento M1 de las subunidades del receptor nicotínico muscular adulto (AChR) mostró un patrón de conservación diferencial para ciertos residuos. En estudios previos demostramos que el residuo 15' de M1 de la subunidad β es importante para el correcto funcionamiento del receptor (Spitzmaul *et al.*, 2004). Dicho residuo presenta una conservación particular, siendo fenilalanina en las subunidades tipo α , e isoleusina en las no- α (Figura I.2).

En la primer parte del desarrollo del presente capítulo demostramos la implicancia del residuo 15' del segmento M1 de las subunidades α , ε , y δ en el gatillado del canal. Para todos los casos mutamos el residuo presente en dicha posición a distintos aminoácidos hidrofóbicos. A partir del análisis del efecto provocado por dichas mutaciones, demostramos que en la mayoría de los casos ocurre un aumento en la P_{apertura} del canal (Figura I.3), el cual puede ser debido a un aumento en la velocidad de apertura (β_2). Este aumento llevaría a la pérdida de eventos de cierre dentro de los *clusters* debido a la limitación del equipo de *patch-clamp* para resolver tiempos inferiores a 20-30 μs . Para superar dicho inconveniente, utilizamos colina, un agonista parcial que provoca la apertura del receptor con una velocidad unas 600 veces más lenta que la alcanzada con ACh.

A partir del análisis cinético realizado sobre los receptores salvaje y mutados en 15' de cada subunidad, comprobamos que el principal efecto provocado por las mutaciones es un aumento en la velocidad de apertura β_2 (Figura I.4, Tabla I.2). Estudios previos reportaron que mutaciones sobre residuos que se mueven en las fases iniciales del proceso de gatillado del canal afectan principalmente dicha velocidad (Mitra *et al.*, 2005).

De esta manera comprobamos que el residuo 15' de M1, tanto de las subunidades α como ε y δ , afecta el correcto funcionamiento del receptor (Figura I.4). Vimos que dicho efecto presenta una correlación con el volumen del residuo en esta posición (Figura I.5). Un **aumento** en el volumen de la cadena lateral del aminoácido en 15' de M1, tanto en las subunidades ε como δ , produce un **aumento** en la constante de gatillado del canal. El efecto opuesto se observó para la subunidad α , donde un

aumento en el volumen de la cadena lateral del aminoácido **disminuye** el valor de la constante de gatillado del canal. Cuando el aminoácido en $\alpha 15'$ de M1 fue triptofano (W), observamos un efecto particular, ya que a pesar de ser el aminoácido con la cadena lateral de mayor volumen, presentó la mayor constante de gatillado (Figura I.5). Este resultado puede ser interpretado en vista de las características particulares de dicho aminoácido otorgadas por la presencia de su anillo indol. Gracias a la nube de electrones π que presenta a ambas caras de este anillo, el W tiene la posibilidad de interactuar con otros aminoácidos circundantes por medio de diversos tipos de enlaces (Stollar *et al.*, 2004; Ridder *et al.*, 2005). Dichas interacciones permitirían acomodar la cadena lateral de este residuo facilitando así el gatillado del canal.

La apertura del canal implica la transmisión de la información desde el sitio extracelular donde se une el agonista hasta la compuerta del canal ubicada en la región intermedia del poro (ver Introducción). Para conocer la secuencia de movimientos que están involucrados en el gatillado, se utilizó el análisis de energía libre en el equilibrio (REFER) (Grosman y Auerbach, 2000a; Grosman C., 2002; Spitzmaul *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2005; Jha *et al.*, 2007). Por medio de dicho análisis obtuvimos el valor Φ para los residuos $15'$ de las tres subunidades evaluadas. Φ estima cuán similar a la conformación en el estado abierto es la estructura del residuo en el estado de transición durante el gatillado (ver Metodología). Para todos los casos, el valor Φ fue $\sim 0,7$; indicando que estos residuos se mueven durante las fases iniciales del gatillado del canal (Grosman C., 2002; Mitra *et al.*, 2005), y que esto ocurre, además, en forma concertada entre las distintas subunidades.

El análisis de la estructura del receptor a 4 \AA de resolución (código de acceso a PDB: 2bg9) permitió tener una imagen más precisa de la estructura tridimensional del receptor, confirmando la disposición y orientación de sus segmentos transmembranales (Miyazawa *et al.*, 2003). Sin embargo, esta resolución no es suficiente como para dar información fehaciente acerca de la disposición de las cadenas laterales de los aminoácidos. De la inspección de la estructura obtenida, los autores propusieron la posible interacción entre ciertos residuos de las distintas

hélices transmembranales, postulando que la fenilalanina 225 (F15' de M1) de la subunidad α podría estar lo suficientemente cerca de la leucina 253 (L11' de M2) de la misma subunidad como para estar interactuando directamente. Dicha interacción afectaría el libre movimiento de los anillos interno y externo que conforman la región transmembranal del canal afectando así su correcto gatillado (Miyazawa *et al.*, 2003).

Realizando mutaciones puntuales y utilizando el ciclo de doble mutante, confirmamos la existencia de una interacción directa entre ambos residuos, y demostramos que dicha interacción jugaría un rol importante en el gatillado del canal. Ambas mutaciones puntuales realizadas en forma individual (simple-mutantes) generaron efectos opuestos sobre la cinética del receptor. Determinamos que la mutación en M2 (α M2-L11'F) afectó principalmente la velocidad de apertura, disminuyéndola unas 10 veces, mientras que la mutación en M1 (α M1-F15'L) generó el efecto opuesto, aumentando dicha velocidad unas 15 veces. Cuando realizamos ambas mutaciones simultáneamente (doble-mutante), el receptor presentó una activación semejante a la del receptor salvaje (Figura I.7), indicando que ambos sitios son intercambiables y que para el correcto funcionamiento del receptor es fundamental la presencia del par leucina-fenilalanina (L-F). A partir de estudios estadísticos, algunos autores propusieron que dicha interacción (L-F) es altamente frecuente entre hélices transmembranales, cumpliendo funciones de estabilización entre las mismas. Dichas interacciones serían importantes para el mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína (Adamian y Liang, 2001; Adamian *et al.*, 2003).

El cambio de energía libre en el gatillado para el receptor doble-mutante fue significativamente diferente de la suma de los cambios de energía libre para cada simple-mutante (Figura I.8), indicando que ambos residuos se encuentran energéticamente acoplados (Hidalgo y MacKinnon, 1995; Schreiber y Fersht, 1995), con un valor de energía de acoplamiento de -1,2 kcal / mol.

El análisis de la estructura del receptor en base al modelo publicado demostró que las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman los segmentos transmembranales se encuentran separados, y el espacio entre

ellos ocupado por moléculas de agua (Miyazawa *et al.*, 2003). La distancia entre los residuos α L253 y α F225 (L11' de M2 y F15' de M1) daría a la proteína la posibilidad de mover libremente ambas hélices (Figura I.10A). La presencia de la mutación α M1-F15'L genera el par leucina-leucina, dejando más libertad de movimiento a ambas cadenas transmembranales (Figura I.10B), facilitando por lo tanto el gatillado del canal. En cambio, el aumento en el volumen de la cadena lateral generado en la mutación α M2-L11'F, restringe dicho movimiento, dificultando así el gatillado del canal (Figura I.10C). Como podemos ver en la figura, una de las posibles conformaciones que adoptan ambas cadenas laterales conteniendo el par F-F, muestra la interacción "edge-to-face" (orientación perpendicular de ambos anillos fenólicos), la cual otorga rigidez a dicha interacción, ya que es muy estable debida a la distribución de cargas generada en ambos anillos por la resonancia de los electrones π (Figura I.10) (Singh J. y Thornton J.M., 1985; Burley y Petsko, 1986; Hunter *et al.*, 1991; Sinnokrot y Sherrill, 2004).

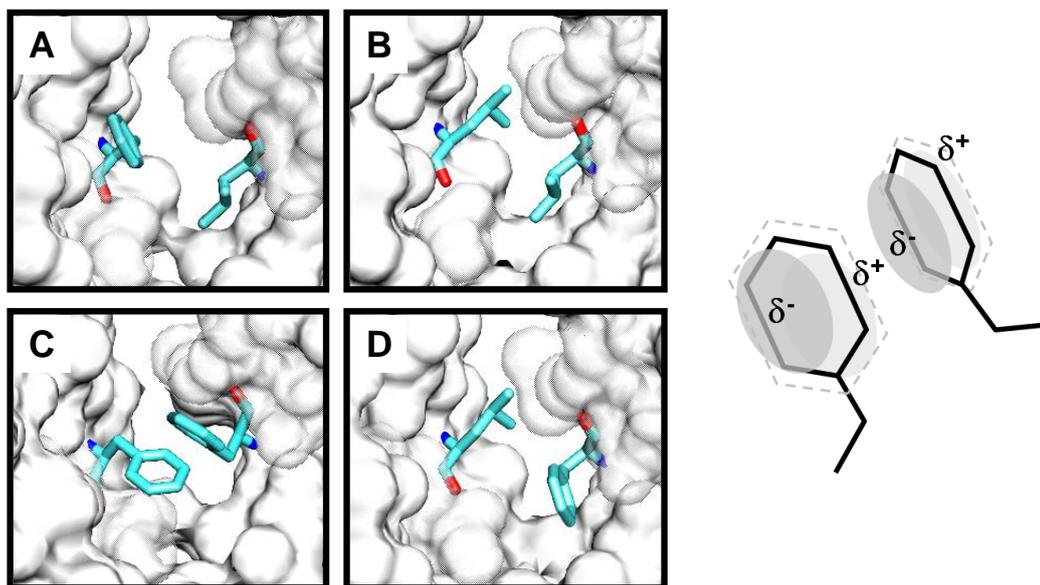


Figura I.10: Modelado de los residuos en M1 y M2 de la subunidad α . *Izquierda:* Los aminoácidos 15' de M1 (izquierda en cada recuadro) y 11' de M2 (derecha en cada recuadro) se muestran como barras celestes. **A:** salvaje; **B:** α M1-F15'L; **C:** α M2-L11'F; y **D:** α M1-F15'L + α M2-L11'F. *Derecha:* Esquema de la interacción *edge-to-face* entre dos residuos F. Se observa la estabilización de dicha conformación gracias a la distribución de cargas debido a la resonancia de los electrones del anillo fenólico.

Finalmente, al generar el receptor doble-mutante, se restituye el par leucina-fenilalanina, permitiendo una libertad de movimiento semejante a la del receptor salvaje (Figura I.10D).

Tomando en conjunto estos resultados, podemos concluir que los residuos 15' del segmento M1, tanto de la subunidad α como también ε y δ , son importantes para el correcto funcionamiento del canal. Demostramos que para la subunidad α la capacidad del canal para activarse se relaciona con el volumen del residuo en dicha posición. Demostramos experimentalmente que el residuo en 15' de M1 interactúa directamente con el residuo 11' del segmento M2 de la subunidad α , siendo esta interacción, probablemente, la responsable del efecto observado entre el volumen del residuo 15' y la eficiencia del receptor para activarse.

Al generar la mutación α M1-F15'W sobre el modelo *in silico*, observamos que uno de los rotámeros más estables propuesto por el programa (Swiss-PDB Viewer v3.7) presenta la cadena lateral del W totalmente desplazada de la interacción con el residuo L11' de M2. Esto otorgaría mayor libertad al segmento M2 para moverse durante el gatillado y podría explicar los motivos por los cuales esta mutación presentó la mayor eficiencia en el gatillado del canal.

Capítulo 11

Capítulo II: Mecanismos de activación del receptor de serotonina 5-HT_{3A}.

Introducción.

FAMILIA DE RECEPTORES ACTIVADOS POR SEROTONINA.

La serotonina (5-HT: 5-hidroxitriptamina) es una amina derivada del metabolismo del triptofano, la cual ejerce su acción tanto como hormona o como neurotransmisor. Su principal fuente en el organismo es el intestino, por ello fue el primer lugar donde fue identificada (1930) y llamada **enteramina**. Luego, esta misma sustancia fue redescubierta durante la década del 40 en la circulación sanguínea y denominada **serotonina**, debido a su acción vasoconstrictora (del latín *serum* = suero, y *tonos* = tensión).

Debido a que la 5-HT puede generar su acción sobre una amplia familia de receptores distribuidos en diversos tejidos, posee un gran número de funciones biológicas. Sus receptores se encuentran en sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), así como también en un amplio número de tejidos no neuronales, tales como intestino, sistema cardiovascular y sangre. El sistema serotoninérgico es uno de los más antiguos en términos evolutivos, lo que explica su amplia distribución en tejidos y el gran número de receptores involucrados, los que además, ejercen su función a través de mecanismos muy diferentes (Hannon J. y Hoyer D., 2002; Gillette R., 2006). En 1954 se describió por primera vez la acción de 5-HT sobre íleon de cobayo (*Cavia porcellus*), donde fueron observados dos efectos muy distintos, los cuales fueron atribuidos a la acción de la droga sobre dos tipos diferentes de receptores. Uno de estos receptores provocó su efecto en forma inmediata sobre el músculo liso, y su acción fue bloqueada por dibenzileno (D), el otro actuó a través de la liberación concomitante de acetilcolina desde las terminales nerviosas pre-sinápticas, y en este caso el efecto fue bloqueado por morfina (M). Por lo tanto, una primera clasificación de estos receptores derivó de la observación de dichos efectos, denominando receptores **tipo D** a aquellos pertenecientes a músculo liso y **tipo M** a aquellos presentes en las

terminales nerviosas (Gaddum y Picarelli, 1957). Luego de esa primera clasificación, fue notable el aumento del número de receptores identificados integrantes de esta familia. A principio de los años 90 surgió un nuevo sistema de nomenclatura propuesto por el Comité Clasificador de los Receptores de Serotonina y avalado por el Comité Nomenclador de la Unión Internacional de Farmacología (NC-IUPHAR: <http://www.iuphar-db.org/>). Este sistema considera la estructura del receptor, su mecanismo de acción y el sistema de transducción utilizado (Hoyer *et al.*, 1994). Así es cómo, actualmente, la familia de receptores de serotonina se encuentra dividida en dos grandes grupos que difieren en el mecanismo por el cual transmiten su señal al interior celular (Figura II.1). Uno de estos grupos contiene receptores que pertenecen a la familia de canales iónicos gatillados por ligando (LGIC). El segundo grupo pertenece a la gran familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR: *G-Protein Coupled Receptors*). Ambos grupos conforman una amplia familia de receptores compuesta hasta el momento por 22 miembros, los que a su vez están divididos en 7 subgrupos o clases de receptores (5-HT₁-5-HT₇).

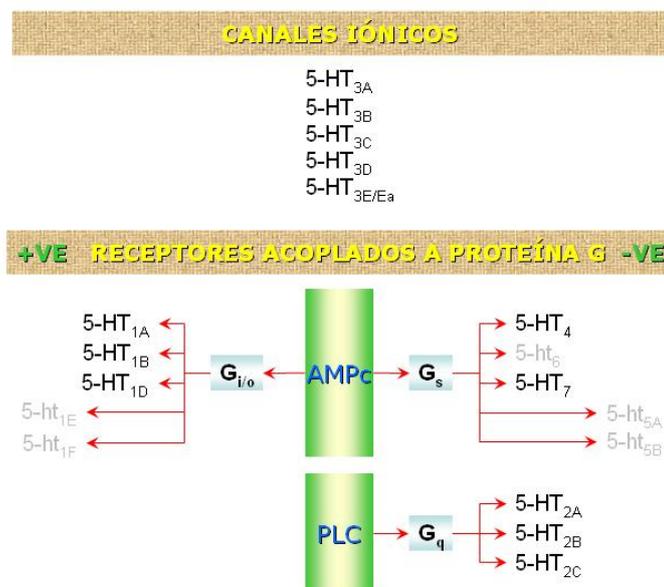


Figura II.1: Clasificación de la familia de receptores de serotonina.

Se observan los dos grandes grupos en los que se divide (recuadros marrón), como así también las subdivisiones dentro de la familia de receptores acoplados a proteína G en base al mecanismo utilizado para transducir la señal al interior celular (recuadros verdes). En gris se destacan aquellos miembros cuyas proteínas no han sido identificadas todavía (Hannon J. y Hoyer D., 2002). AMPc: Adenosina cíclica 3'-5' monofosfato. PLC: Fosfolipasa C; -VE: acción negativa; +VE: acción positiva.

RECEPTORES DE SEROTONINA ACOPLADOS A PROTEÍNA G.

El mecanismo compartido por la mayoría de los miembros de la familia de receptores activados por serotonina, excepto el receptor tipo 3, es a través de la acción de proteínas integrales de membrana conocidas como proteínas G. En este caso, algunas de ellas pueden realizar su función modulando la respuesta de receptores metabotrópicos o participando en vías que median el desarrollo neuronal.

Este tipo de receptores pertenece a la familia de proteínas de 7 hélices transmembranales, que acoplan una señal recibida desde el espacio extracelular a mecanismos intracelulares que modulan distintas funciones. Según la enzima a la que se asocien, pueden cumplir funciones de activación o inhibición. En base a estudios por homología, el receptor tipo 3 es considerado el ancestro común para todos los miembros de esta familia, por lo que los GPCR representan un avance evolutivo respecto de los receptores ionotrópicos (Figura II.2). (Peroutka S.J., 1994; Uphouse L., 1997; Gillette R., 2006).

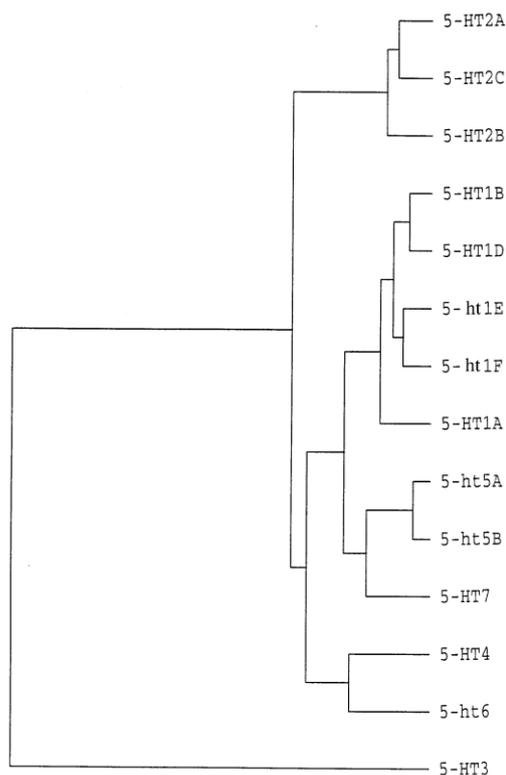


Figura II.2: Dendrograma mostrando la relación evolutiva entre distintos miembros de la familia de receptores de serotonina humana (excepto 5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}, los cuales han sido demostrados hasta el momento solo en ratón (Barnes y Sharp, 1999)).

RECEPTOR DE SEROTONINA TIPO 3.

Como se vio hasta ahora, dentro de la amplia variedad de receptores activados por serotonina se encuentra un grupo de proteínas que es capaz de asociarse para formar complejos que constituyen receptores de membrana que conforman un canal iónico.

El receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃R) comparte grandes similitudes farmacológicas con aquellos receptores de serotonina denominados en los 50 como receptores tipo M (Gaddum y Picarelli, 1957). A partir de estudios electrofisiológicos y análisis de secuencia, se lo incluyó dentro de la familia LGIC en base a que: i) su mecanismo de acción no requiere la activación de proteínas G de membrana, y ii) presenta un 20-30% de identidad de secuencia aminoacídica y una estructura secundaria y terciaria similar a la de otros miembros de esta familia (Yakel y Jackson, 1988; Derkach *et al.*, 1989; Maricq *et al.*, 1991; Boess *et al.*, 1995). Así es cómo el análisis de hidrofobicidad de sus residuos predice una disposición estructural con cuatro segmentos transmembranales (M1-M4), donde el segmento M2 forma las paredes del poro iónico. Presenta un largo dominio NH₂-terminal extracelular, un segmento corto COOH-terminal extracelular y un gran *loop* citoplasmático conectando los segmentos M3-M4. Además de esto, posee también dos residuos cisteína en el dominio NH₂-terminal, los cuales forman un puente disulfuro generando un *loop* característico (*cys-loop*) para todos los miembros de esta familia de receptores (Maricq *et al.*, 1991; Thompson y Lummis, 2007) (ver Introducción).

Estudios electrofisiológicos llevados a cabo tanto en cultivo de células de hipocampo como en líneas celulares, mostraron corrientes macroscópicas con un tiempo de activación del orden de los milisegundos, las cuales decaen por desensibilización en presencia constante de 5-HT (Yakel y Jackson, 1988; Neijt *et al.*, 1989). Todos estos resultados llevaron a identificar un nuevo mecanismo por el cual la 5-HT actúa como neurotransmisor en sinapsis excitatorias rápidas por medio del receptor 5-HT₃.

La primera subunidad clonada capaz de formar receptores de membrana fue denominada 5-HT_{3A}. Su ADNc se obtuvo a partir de líneas celulares derivadas de neuroblastoma de ratón. Las células expresando dicha subunidad fueron evaluadas por técnicas electrofisiológicas y respondieron a la aplicación de 5-HT mostrando las corrientes macroscópicas características. Estas corrientes aumentaban su respuesta en relación a la concentración de agonista, se desensibilizaban en presencia constante del mismo, eran producidas incluso al utilizar 2-metil-serotonina (2-Me-5HT) durante la perfusión (un agonista parcial y altamente selectivo para receptores 5-HT₃), y eran bloqueadas por la acción de antagonistas de estos receptores, como curare y MDL-72222 (Maricq *et al.*, 1991; Hussy *et al.*, 1994). Estos resultados permitieron definir sus características electrofisiológicas, tales como una muy baja conductancia, de alrededor de 0,4-0,6 pS, un EC₅₀ = 2-3 μM, y un coeficiente de Hill de ~2.

Los resultados obtenidos a partir de receptores homopentaméricos 5-HT_{3A} expresados en forma heteróloga, asemejaron a aquellos obtenidos a partir de ciertas líneas celulares neuronales, lo que indicaría que este receptor sería el expresado principalmente en dichas células. Sin embargo, se observaron ciertas diferencias para algunos tipos celulares, lo que llevó a pensar en la presencia de otros tipos de receptores sensibles a 5-HT, los que podrían estar constituidos por otras subunidades no conocidas hasta ese momento (Yang J., 1990; Hussy *et al.*, 1994). En todos los tejidos a partir de los cuales se obtuvieron corrientes activadas por 5-HT se aisló ARNm que codifica para la subunidad 5-HT_{3A}, por lo tanto, estos receptores deben contener al menos dicha subunidad (Hussy *et al.*, 1994). Recientemente se han identificado los genes, y aislado y demostrado la expresión en superficie de cinco subunidades del receptor 5-HT₃ (5-HT_{3A}-5-HT_{3E}), además de las variantes de *splicing* A_s, A_L y E_a (Niesler *et al.*, 2003; Niesler *et al.*, 2007; Niesler *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha demostrado, por medio de estudios de expresión heteróloga, la combinación de la subunidad A del receptor de serotonina con subunidades pertenecientes a otros receptores, tales como la subunidad α4 del receptor de acetilcolina (van Hooft *et al.*, 1998; Kriegler *et al.*, 1999). Todo esto

podría explicar la gran variedad de respuesta observada en los distintos tejidos estudiados.

Hasta el momento, solo han sido estudiadas dos proteínas de la familia 5-HT₃ capaces de formar receptores funcionales en forma heteróloga. Estas subunidades son la subunidad A, la cual puede ensamblarse formando receptores homoméricos (Maricq *et al.*, 1991; Hussy *et al.*, 1994; Hanna *et al.*, 2000; Mott *et al.*, 2001), y la subunidad B, la cual se encuentra casi exclusivamente expresada en sistema nervioso periférico, y solo forma receptores heteroméricos cuando se expresa junto a la subunidad A donde tendría aparentemente una función moduladora (Davies *et al.*, 1999; Dubin *et al.*, 1999; Brady *et al.*, 2001; Hapfelmeier *et al.*, 2003).

Como se mencionó anteriormente, el receptor homomérico 5-HT_{3A} forma canales que poseen una muy baja conductancia (<1 pS), lo que imposibilita su estudio por medio de registros de canal único. Cuando las subunidades A y B se expresan en conjunto, los receptores heteroméricos presentan una mayor conductancia, detectable a nivel de canal único (9-17 pS) (Hanna *et al.*, 2000; Kelley *et al.*, 2003). Por medio de la construcción de subunidades quiméricas A-B, se demostró que tres residuos arginina presentes en la hélice- α del *loop* intracelular M3-M4 (hélice MA o HA) son componentes fundamentales en la determinación de la conductancia del receptor homomérico 5-HT_{3A}. Estas argininas no se encuentran en la subunidad B (Kelley *et al.*, 2003), encontrando en las posiciones equivalentes para la subunidad humana residuos glutamina (Q), aspártico (D) y alanina (A) (Figura II.3). Al mutar simultáneamente las argininas de la subunidad A por los residuos presentes en la subunidad B (R432Q/R436D/R440A) se obtiene un receptor homomérico de alta conductancia (5-HT_{3A}R-AC), el cual puede ser estudiado por la técnica de *patch-clamp* a nivel de canal único (Kelley *et al.*, 2003; Bouzat *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2006; Bouzat *et al.*, 2008). Esta propiedad fue utilizada en este trabajo de tesis doctoral para caracterizar la cinética de activación del receptor 5-HT_{3A}.

		Hélice - MA																			
		432				436				440											
humano	5-HT _{3A}	S	I	R	Q	F	L	E	K	R	D	E	I	R	E	V	A	R	D	W	L
ratón	5-HT _{3A}	S	I	R	H	S	L	E	K	R	D	E	N	R	E	V	A	R	D	W	L
humano	5-HT _{3B}	S	I	S	N	Y	L	Q	T	Q	D	Q	T	D	Q	Q	E	A	E	W	L
ratón	5-HT _{3B}	S	I	N	N	S	L	R	T	R	D	Q	V	Y	Q	K	E	V	E	W	L
torpedo	nAChR α	Y	I	A	E	H	M	K	S	D	E	E	S	S	N	A	A	E	E	W	K
torpedo	nAChR β	Y	I	A	E	Q	L	E	S	A	S	E	F	D	D	L	K	K	D	W	Q
torpedo	nAChR γ	F	I	A	K	S	T	K	E	Q	N	D	S	G	S	E	N	E	N	W	V
torpedo	nAChR δ	Y	I	V	K	Q	I	K	E	K	N	A	Y	D	E	E	V	G	N	W	N
humano	nAChR α 1	Y	I	A	E	T	M	K	S	D	Q	E	S	N	N	A	A	A	E	W	K
humano	nAChR β 1	Y	I	A	R	Q	L	Q	E	Q	E	D	H	D	A	L	K	E	D	W	Q
humano	nAChR δ	F	I	V	N	H	M	R	D	Q	N	N	Y	N	E	E	K	D	S	W	N
humano	nAChR ϵ	F	V	A	E	S	T	R	D	Q	E	A	T	G	E	E	V	S	D	W	V
humano	nAChR α 7	Y	I	A	N	R	F	R	C	Q	D	E	S	E	A	V	C	S	E	W	K
		-4'				0'				4'											

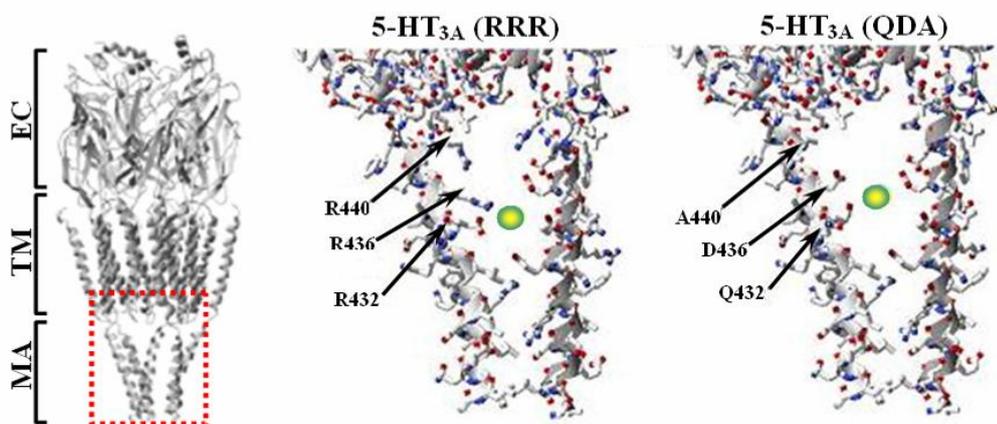


Figura II.3: Mutaciones que llevan al aumento de la conductancia del canal del receptor 5-HT_{3A}.

Arriba: Alineamiento de las secuencias de la hélice intracelular de distintas subunidades de AChR y 5-HT_{3A}R. *Abajo izquierda:* Estructura del 5-HT_{3A}R mostrando la zona donde se introdujeron las mutaciones (recuadro rojo). *Abajo derecha:* Modelo de las hélices intracelulares MA mostrando el posible efecto provocado por las mutaciones que lleva finalmente al aumento de la conductancia del canal. Se muestra un átomo de K⁺ (verde) tomado como referencia, el cual muestra menos interacción con las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman las hélices en el receptor "QDA" (Hales et al., 2006).

El receptor de serotonina tipo 3 (5-HT₃R) se halla ampliamente distribuido tanto en neuronas del sistema nervioso central como periférico (Figura II.4), donde genera una rápida despolarización de la membrana celular al ser activado, lo que provoca el rápido ingreso de cationes a la

célula (ingreso de Na^+ y Ca^{2+} con el egreso concomitante de K^+), (Derkach *et al.*, 1989).

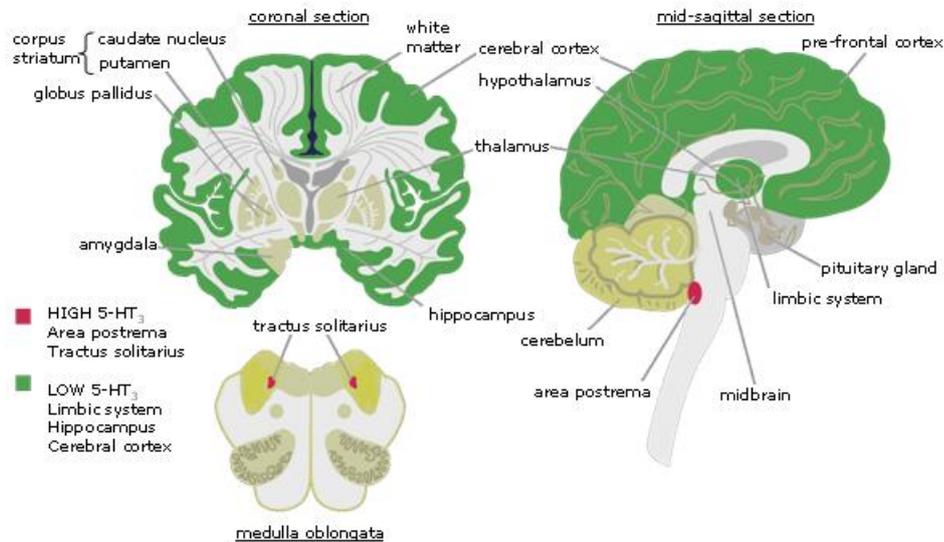


Figura II.4: Distribución del receptor 5-HT₃ en distintas áreas del cerebro. Se observan en distintos colores las zonas de alta y baja densidad de receptores.

El receptor 5-HT₃ se encuentra, además, expresado en ganglios periféricos, donde se cree que sería responsable de la modulación de la respuesta al dolor y controlaría reflejos tanto del sistema entérico como cardiovascular (Hanna *et al.*, 2000). En sistema nervioso central, se encuentra en varias regiones del cerebro, incluyendo la capa de células piramidales CA1 del hipocampo, el núcleo dorsal motor del tracto solitario y el área postrema (el potencial centro del vómito) (Laporte *et al.*, 1992). También se encuentra expresado en regiones pre- y post-sinápticas, donde modula la liberación de neurotransmisores, tales como dopamina, colecistoquinina, GABA, sustancia P y acetilcolina (van Hooft y Vijverberg, 2000; Thompson y Lummis, 2007).

Debido a sus variadas e importantes funciones, el estudio de este receptor ha sido de gran interés clínico en el tratamiento de distintas afecciones, tales como:

- control de náuseas y vómito, lo que sería importante para el tratamiento durante embarazo, en pacientes expuestos a quimioterapia y tratamiento post-operatorio debido al efecto de los anestésicos.
- su intervención en el control de la liberación de neurotransmisores le daría especial importancia en el tratamiento de disfunciones a nivel central, tales como ansiedad, esquizofrenia, desórdenes del comportamiento, desórdenes alimenticios (bulimia y anorexia) y mejoras a nivel cognitivo que podrían significar una vía de tratamiento para enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, etc. (Barnes y Sharp, 1999).
- su control a nivel periférico es de suma importancia para el tratamiento en individuos con síndrome de colon irritable (Kwan *et al.*, 2005).

Objetivos.

En vista del creciente conocimiento acerca de su estructura y funcionamiento, y en base a su participación en tan variadas disfunciones del organismo, el receptor 5-HT₃ ha sido blanco de numerosos estudios durante los últimos veinte años. Sin embargo, poco se sabe a nivel molecular acerca de los mecanismos que modulan su activación, y solo se han propuesto algunos modelos cinéticos en base al análisis de sus corrientes macroscópicas.

Nuestros objetivos en el desarrollo dentro de este capítulo buscan:

- 1) Caracterizar al receptor 5-HT_{3A} de alta conductancia a nivel de canal único a través de la técnica de *patch-clamp*. Definir, en base a las constantes macroscópicas y microscópicas obtenidas, un modelo cinético que represente los mecanismos de activación, desensibilización y recuperación del receptor. Esto será de gran ayuda al momento de identificar y caracterizar los mecanismos por los cuales se ve afectada su correcta funcionalidad debido a mutaciones puntuales o drogas que actúan modulando su función.
- 2) Identificar residuos pertenecientes a los segmentos transmembranales que puedan afectar el correcto funcionamiento del receptor. Esto permitirá comprender aún más los mecanismos que gobiernan su cinética.

Desarrollo y Resultados.II.1) CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{3A} DE ALTA CONDUCTANCIA.

Utilizando el receptor de alta conductancia (5-HT_{3A}R-AC), realizamos registros de *patch-clamp* en las configuraciones *outside-out* y *cell-attached* para caracterizar dicho receptor y poder definir un esquema cinético que sirva como modelo para el receptor homomérico salvaje.

Todos los registros obtenidos fueron realizados en ausencia de Mg²⁺ y baja concentración de Ca²⁺ (0,2 mM para canal único y 0,5 mM para corrientes macroscópicas) para evitar la disminución de la conductancia del canal debida a bloqueo por dichos cationes (Brown *et al.*, 1998; Hu y Lovinger, 2005; Livesey *et al.*, 2008).

II.1.1) Activación por serotonina (5-HT).

Corrientes macroscópicas.

Obtuvimos corrientes macroscópicas en la configuración *outside-out* activando al receptor 5-HT_{3A}-AC con concentraciones crecientes de 5-HT entre 0,1 y 100 μM. Las corrientes obtenidas a concentraciones menores a 5 μM se activan lentamente mostrando una lenta desensibilización en presencia constante de agonista. Dichas caídas ajustan correctamente con una función exponencial simple (Tabla II.1) (Figura II.5). A concentraciones menores a 1 μM no fue posible registrar corrientes, debido a que solo se observaron canales individuales en los registros.

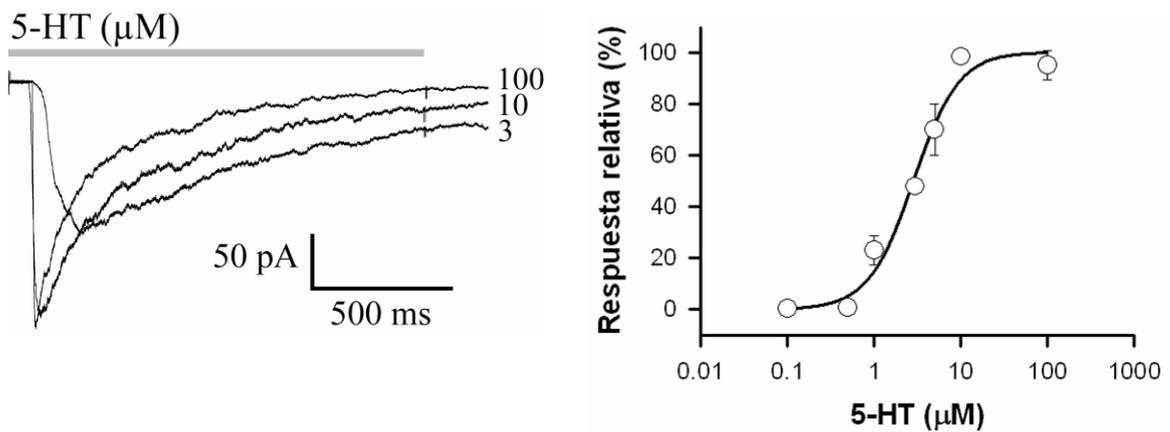


Figura II.5: Corrientes macroscópicas obtenidas de la activación del receptor 5-HT_{3A}-AC.

Izquierda: Corrientes obtenidas en la configuración *outside-out* a las concentraciones de 5-HT indicadas. *Derecha:* Curva dosis-respuesta para dicho receptor.

Filtro 5 kHz, potencial de membrana -50 mV.

A concentraciones de 5-HT superiores a 5 μM, la caída de las corrientes ajustó correctamente con una doble exponencial (Figura II.5, Tabla II.1), como fue demostrado previamente para el receptor salvaje (Yakel y Jackson, 1988; Yakel *et al.*, 1991; Hapfelmeier *et al.*, 2003). Dichas caídas mostraron un componente lento (τ_{lento}) y uno rápido ($\tau_{\text{rápido}}$), siendo ambos dependientes de la concentración de agonista. A medida que aumentamos la concentración de agonista, aumenta la velocidad de caída de ambos componentes (Figura II.6, Tabla II.1).

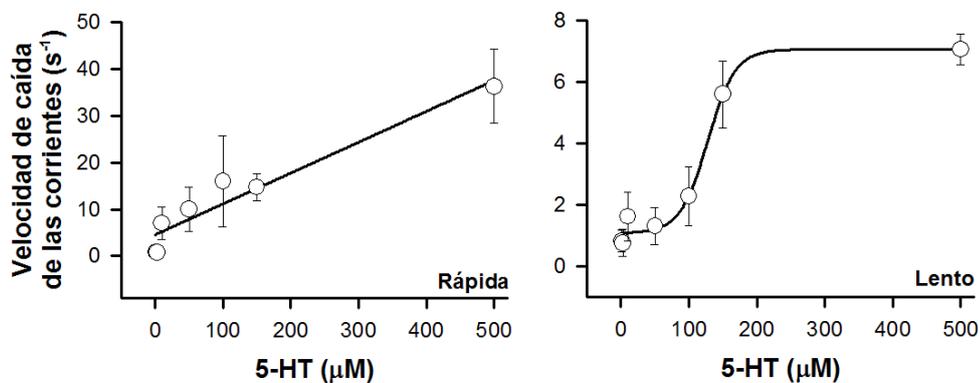


Figura II.6: Velocidad de caída de las corrientes macroscópicas.

Aumento de la velocidad de caída en función de la concentración de 5-HT de ambos componentes de las corrientes obtenidas en configuración *outside-out*.

[5-HT]	τ_{lento} (ms) área	$\tau_{\text{rápida}}$ (ms) área	t_{20-80} (ms)
3	1.350 ± 700 1	---	100 ± 40
10	630 ± 300 $0,24 \pm 0,10$	140 ± 70 $0,76 \pm 0,15$	6 ± 3
50	770 ± 350 $0,22 \pm 0,05$	100 ± 47 $0,78 \pm 0,05$	5 ± 1
100	440 ± 190 $0,24 \pm 0,10$	62 ± 38 $0,76 \pm 0,10$	3 ± 1

Tabla II.1: Corrientes macroscópicas obtenidas a partir de registros obtenidos en configuración *outside-out* para el receptor 5-HT_{3A}-AC. Los datos se expresan como la media \pm desvío estándar de al menos tres registros para cada concentración.

En base al porcentaje de respuesta en función de la concentración de agonista, graficamos la correspondiente curva dosis-respuesta (Figura II.5) a partir de la cual obtuvimos valores de EC₅₀ y coeficiente de Hill de $2,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$ y $1,5 \pm 0,4$, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente para receptores salvajes expresados en tejido, en cultivos celulares de neuronas y en forma heteróloga (Yakel y Jackson, 1988; Maricq *et al.*, 1991; Yakel *et al.*, 1991; Hussy *et al.*, 1994; Mott *et al.*, 2001; Solt *et al.*, 2007).

Por lo tanto, las mutaciones que provocan el aumento de la conductancia del canal no afectan significativamente el comportamiento del receptor, siendo un modelo válido que permite superar el inconveniente de la baja conductancia del receptor salvaje y posibilita entonces su estudio a nivel de canal único.

Registros de canal único.

Los registros de canal único obtenidos a partir del receptor 5-HT_{3A}-AC presentan canales con una amplitud de $4,7 \pm 0,4 \text{ pA}$ a un potencial de membrana de -70 mV . A partir de estos registros realizamos una curva corriente-voltaje (Curva I-V) para definir la conductancia del canal. Al

graficar la corriente en función del voltaje obtuvimos una relación que muestra una leve rectificación a potenciales positivos de membrana, con una conductancia hacia adentro y hacia fuera de 67 ± 3 y 53 ± 2 pS, respectivamente (Figura II.7). En algunos registros, se pudieron observar eventos de baja conductancia. La amplitud de dichos eventos fue de $\sim 2,4$ pA, y en vista de su aparición esporádica y muy baja frecuencia no fueron tenidos en cuenta para este análisis (Figura II.8).

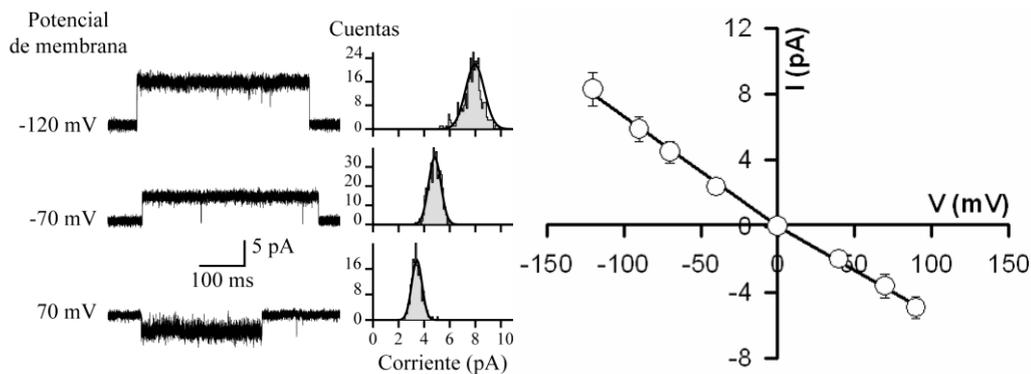


Figura II.7: Conductancia del canal del 5-HT_{3A}R-AC.

Izquierda: Canales obtenidos a los potenciales indicados. Dichos canales fueron activados por 1 μ M de 5-HT. *Centro:* Histogramas de las amplitudes de los canales obtenidos. *Derecha:* Curva I-V obtenida de graficar la corriente (amplitud en pA) en función del potencial de membrana (mV). Los valores experimentales se ajustaron a la Ley de Ohm: $I = \gamma \times V$, donde I corresponde a la amplitud del canal, V es el potencial utilizado y γ es la conductancia del canal (pS).

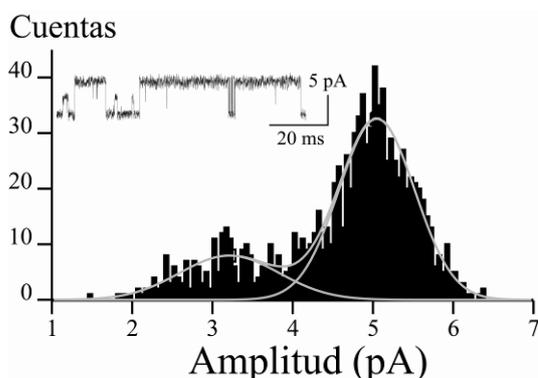


Figura II.8: Amplitud del receptor 5-HT_{3A}-AC.

En este registro en particular se pone en evidencia la presencia de una población minoritaria de canales de baja conductancia. Para este caso los valores de conductancia fueron 3,2 pA y 5,0 pA. *Inserto:* Trazo mostrando eventos de alta y baja conductancia.

La mínima concentración de 5-HT a la cual se observaron eventos de canal único fue 0,1 μ M. A esta concentración se detectan canales en aproximadamente el 10% de los registros realizados, los cuales aparecen

con una muy baja frecuencia. A concentraciones superiores los eventos aparecen con mayor frecuencia, mostrando siempre la misma cinética de activación, con eventos de apertura sucesivas separadas por cierres breves (*bursts*), los cuales presentan una elevada probabilidad de apertura ($P_{\text{apertura}} = 0,99$). Canales similares fueron reportados en por otros autores (Reeves *et al.*, 2005; Hales *et al.*, 2006; Deeb *et al.*, 2007; Bouzat *et al.*, 2008). Estos *bursts* pueden aparecer en forma aislada o agrupados en largos trazos de activación formados por 2 ó 3 de ellos constituyendo un *cluster* (Figura II.9).

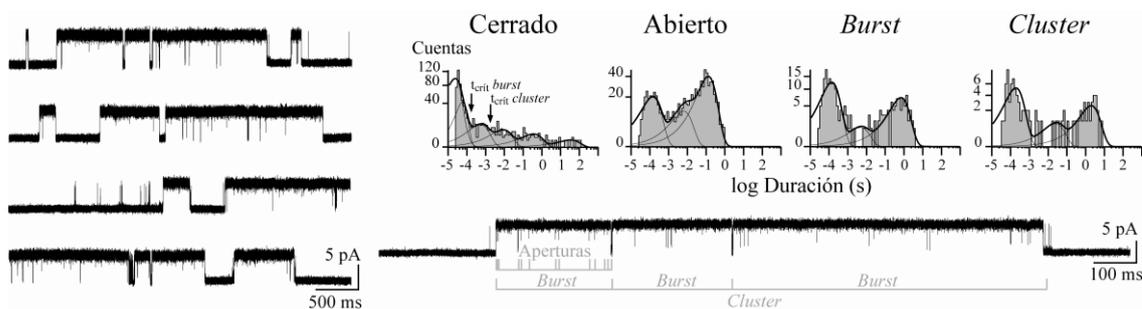


Figura II.9: Registros de canal único del receptor 5-HT_{3A}-AC.

Izquierda: Trazos continuos de canales obtenidos a 3 μM de 5-HT. Se observan aperturas sucesivas separadas por cierres breves (*bursts*), estos a su vez se agrupan para formar un *cluster*. *Derecha arriba:* Histogramas para los tiempos de estado cerrado y abierto, *burst*, y *cluster*. En el histograma de cierres se indican los tiempos críticos considerados para definir el *burst* y el *cluster*. *Derecha abajo:* *Cluster* a mayor resolución. Se observa que está constituido por 3 *bursts* conformados por varios cierres y aperturas. Filtro 10 kHz, potencial de membrana -70 mV.

Para evaluar si la cinética de activación del receptor depende de la concentración de agonista, obtuvimos registros en un rango de concentración de 5-HT entre 0,1-10 μM . De los registros obtenidos a dichas concentraciones definimos los histogramas correspondientes para los tiempos de cierre, apertura, duración del *burst* y duración del *cluster* (Figura II.10). Observamos que la activación del receptor no mostró una cinética dependiente de la concentración de agonista, similar a lo observado para otros receptores homopentaméricos de esta familia (Rayes *et al.*, 2005; Bouzat *et al.*, 2008).

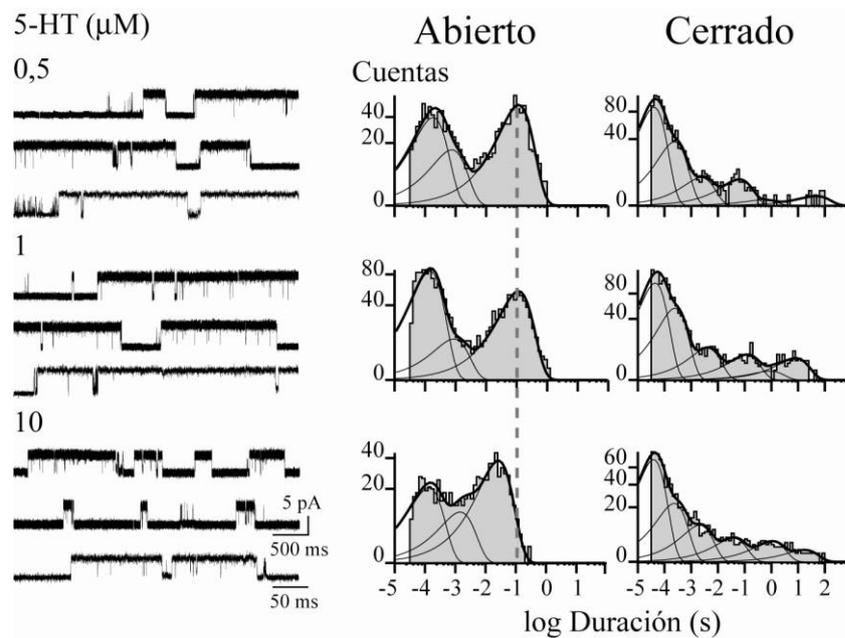


Figura II.10: Dependencia de la concentración de agonista en la activación del receptor 5-HT_{3A}-AC.

Izquierda: Registros de canal único obtenidos a las concentraciones de 5-HT indicadas. *Derecha:* Histogramas de tiempos de estado abierto y cerrado para los distintos registros. Filtro 10 kHz, potencial de membrana -70 mV.

Para los registros obtenidos en este rango de concentraciones, los histogramas de estado cerrado ajustaron en general con seis componentes. Los tres componentes más breves permanecieron invariables a todas las concentraciones evaluadas (Tabla II.2). En cambio, los demás componentes presentaron una gran variabilidad entre registros a distintas e incluso a una misma concentración de agonista (Figura II.10). Por lo tanto, consideramos que los dos cierres más breves pertenecen al *burst*, que junto al cierre inmediatamente mayor, integran los estados de cierre dentro de un *cluster*. De esta manera definimos el tiempo crítico de *burst* a partir de la intersección entre el segundo y el tercer componente de cierre ($\tau_{\text{crít}}^b$), cuyo valor se encuentra entre 0,1-0,5 ms, y el tiempo crítico de *cluster* ($\tau_{\text{crít}}^c$) a partir de la intersección entre el tercer y cuarto componente del histograma de cierre, cuyo valor fue de 5-10 ms (Figura II.9). A partir de este análisis obtuvimos los histogramas respectivos para conocer los tiempos de duración de los *bursts* y los *clusters* para cada registro.

Los histogramas de tiempo de estado abierto pueden definirse por tres componentes principales, uno breve (O_B) de $\sim 200 \mu\text{s}$, intermedio (O_I) de

1-3 ms, y uno largo (O_L) de ~ 120 ms. A partir de $5 \mu\text{M}$ de 5-HT observamos una reducción, tanto en la duración del componente O_L , como en la duración del *burst* y del *cluster* (Tabla II.2, Figura II.10). Esta reducción fue la única variación en el comportamiento del receptor observada en función de la concentración de 5-HT. A $10 \mu\text{M}$ de 5-HT el tiempo de estado abierto O_L se redujo ~ 3 veces ($p < 0,05$; Tabla II.2) y la duración del *cluster* se redujo ~ 6 veces, de 1.400 ms a 225 ms entre 1 y $10 \mu\text{M}$ de 5-HT respectivamente.

[5-HT]	O_L (ms) (área)	O_I (ms) (área)	O_B (ms) (área)	C_L (ms) (área)	C_I (ms) (área)	C_B (ms) (área)
Registros completos						
0,5	110 ± 48	$2,6 \pm 1,9$	$0,21 \pm 0,09$	$2,1 \pm 0,8$	$0,30 \pm 0,15$	$0,05 \pm 0,02$
	$0,38 \pm 0,15$	$0,12 \pm 0,07$	$0,50 \pm 0,13$	$0,08 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,05$	$0,60 \pm 0,14$
1	113 ± 21	$2,4 \pm 1,7$	$0,14 \pm 0,05$	$2,7 \pm 0,9$	$0,30 \pm 0,11$	$0,04 \pm 0,02$
	$0,38 \pm 0,10$	$0,13 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,11$	$0,11 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,12$	$0,54 \pm 0,13$
10	26 ± 9	$1,5 \pm 0,8$	$0,16 \pm 0,05$	$2,7 \pm 1,5$	$0,30 \pm 0,15$	$0,05 \pm 0,02$
	$0,61 \pm 0,12$	$0,14 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,08$
Luego de la selección de los clusters						
0,5	110 ± 16	$2,1 \pm 1,5$	$0,20 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,8$	$0,19 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,01$
	$0,55 \pm 0,30$	$0,14 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,12$	$0,78 \pm 0,12$
1	118 ± 6	$1,6 \pm 0,9$	$0,17 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,6$	$0,19 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,01$
	$0,55 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,11$	$0,05 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,08$	$0,68 \pm 0,09$
10	32 ± 5	$2,9 \pm 1,7$	$0,20 \pm 0,06$	$2,2 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,01$
	$0,59 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,07$	$0,07 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,03$	$0,72 \pm 0,07$

Tabla II.2: Propiedades de activación del receptor a distintas concentraciones de 5-HT. Los datos corresponden a los tiempos de estado abierto y cerrado de los registros completos y posteriores a la selección de los *clusters*. Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar de al menos tres registros para cada concentración.

Bloqueo del canal por 5-HT.

Para evaluar si la reducción del tiempo de estado abierto O_L podría ser debida a un bloqueo de canal abierto provocado por el propio agonista, obtuvimos registros de canal único para el receptor 5-HT_{3A}-AC activando en un rango de concentración de 5-HT más amplio ($0,1$ - $500 \mu\text{M}$). Como mencionamos anteriormente, a concentraciones menores a $5 \mu\text{M}$ no se observa ninguna diferencia en el comportamiento del receptor en función

de la concentración de agonista. A concentraciones superiores, se observa una progresiva disminución en el tiempo de duración del componente O_L , lo que podría estar indicando que el propio agonista (5-HT) estaría actuando como un bloqueador de canal abierto. Para describir la acción del agonista como bloqueador utilizamos el esquema lineal clásico simplificado propuesto para este tipo de bloqueadores (Esquema II.1) (Adams P.R., 1976; Neher y Steinbach, 1978).



Donde C, O (*open*) y OB corresponden al estado cerrado, abierto y abierto bloqueado, respectivamente. Como en este caso el agonista es el agente que actúa como bloqueador, definimos la concentración del bloqueador como la concentración del agonista, $[B] = [5\text{-HT}]$. k_{+b} y k_{-b} son las constantes de bloqueo y desbloqueo, respectivamente. Del esquema se deduce que el tiempo de estado abierto, τ_0 , se relaciona con las velocidades que alejan al receptor de dicho estado de la siguiente manera:

$$\tau_0 = (\alpha + k_{+b}[5\text{-HT}])^{-1} \quad \text{Ecuación II.1}$$

Elevando ambos miembros de la ecuación por -1 obtenemos la siguiente ecuación:

$$1 / \tau_0 = \alpha + k_{+b}[5\text{-HT}] \quad \text{Ecuación II.2}$$

Lo cual corresponde a la ecuación de una recta de pendiente k_{+b} y ordenada al origen α , siendo k_{+b} la constante de bloqueo y α la velocidad aparente de cierre del canal (en este caso τ_0 corresponde a la apertura O_L y α la velocidad de cierre para dicho estado). Al graficar la inversa del tiempo O_L (s) en función de la concentración de 5-HT (M) obtuvimos los siguientes resultados experimentales, los cuales ajustaron correctamente a la ecuación II.2 (Figura II.11, izquierda), dando un valor de $k_{+b} = 1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

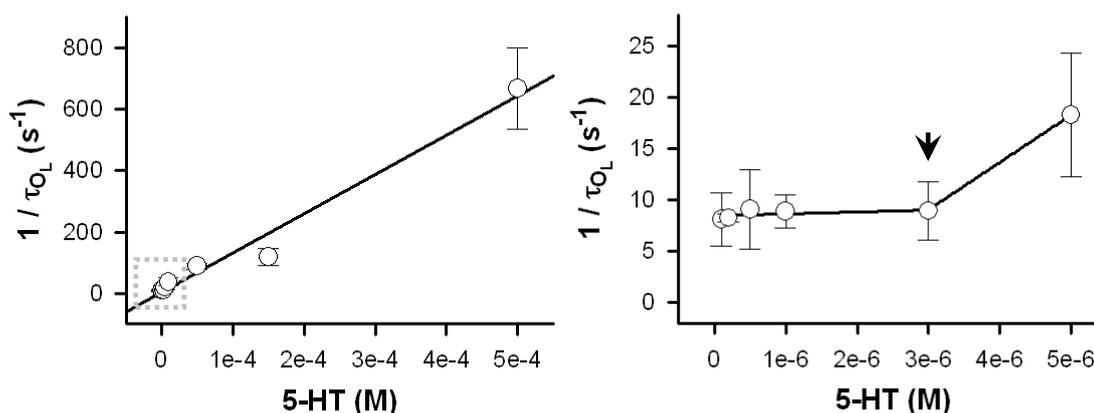


Figura II.11: Bloqueo dependiente de 5-HT.

Izquierda: Reducción del tiempo de estado abierto O_L en función de la concentración de 5-HT. Los puntos fueron ajustados a la ecuación II.2. *Derecha:* Ampliación de la fase inicial de la curva izquierda (recuadro) que muestra la concentración a la cual comienza a evidenciarse el bloqueo (flecha). De la intersección con el eje de las ordenadas se obtiene el valor aparente de α (velocidad de cierre a partir del estado O_L).

El valor de α obtenido a partir del ajuste de la ecuación II.2 a los datos experimentales corresponde a la velocidad de cierre del canal en ausencia total del bloqueador. Al ser en este caso bloqueador y agonista la misma molécula, no es posible obtener el valor de α a concentración cero de 5-HT. Sin embargo, ampliando la curva para los puntos obtenidos a bajas concentraciones de 5-HT se puede ver que el efecto de bloqueo comienza a ser evidente a concentraciones superiores a 3 μ M (Figura II.11, derecha). Extrapolando la recta que ajusta los datos experimentales, el valor obtenido para α a partir de la intersección con el eje de las ordenadas fue de 9 s⁻¹, similar al obtenido del análisis cinético (14 s⁻¹) (ver más adelante).

De los histogramas de tiempo de estado cerrado obtenidos a todas las concentraciones evaluadas de 5-HT no se observó la aparición de un nuevo componente de cierre, el cual correspondería al cierre provocado por el bloqueo. De la inspección visual de los registros de canal único, observamos que los tiempos de cierre dentro del *burst* siguen siendo igualmente breves, lo que indica que el bloqueador se disocia rápidamente. Por lo tanto, supusimos que el nuevo componente de cierre correspondiente

al bloqueo por el agonista debía estar solapado con los componentes mayoritarios (C_B y C_I) de los histogramas de tiempos de estado cerrado.

Para confirmar que 5-HT está actuando como bloqueador del canal, utilizamos la quimera $\alpha 7$ -5HT₃, la cual está conformada por el sitio de unión a agonista específico para acetilcolina y el poro del receptor de serotonina (Eisele *et al.*, 1993; Rayes *et al.*, 2005) (Figura II.12). Para ello, activamos el receptor quimérico con 500 μ M de ACh en ausencia y en presencia de 10 ó 100 μ M de 5-HT. De esta manera ACh actúa como agonista y 5-HT exclusivamente como bloqueador.

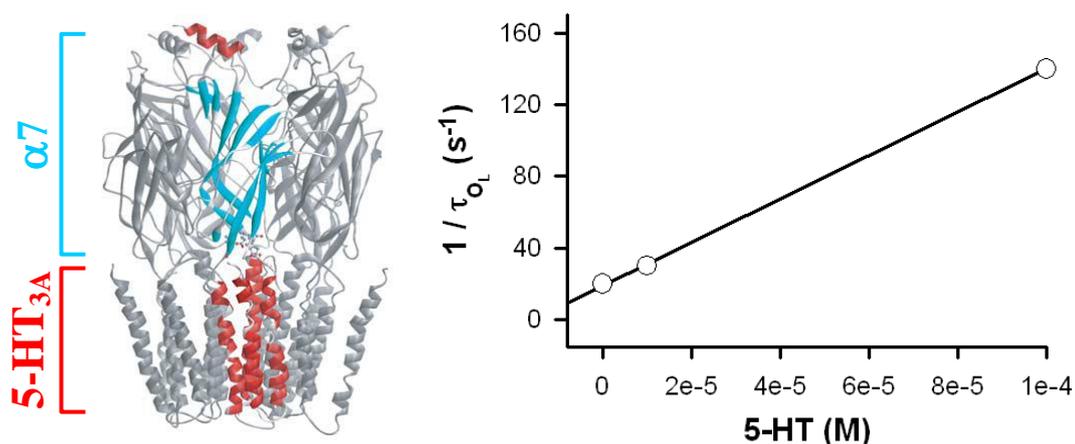


Figura II.12: Bloqueo del poro del canal por 5-HT.

Izquierda: modelo estructural para la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}. *Derecha:* Ajuste de los datos experimentales obtenidos para el tiempo O_L en base a la ecuación II.2. La relación lineal confirma el bloqueo provocado por 5-HT en el poro del receptor.

Del análisis de los registros obtenidos a partir de la quimera $\alpha 7$ -5HT₃, observamos también una reducción del tiempo de estado abierto de larga duración en función de la concentración de 5-HT (Figura II.12). Al graficar la inversa de este tiempo en función de la concentración de 5-HT, los datos experimentales ajustaron correctamente a la ecuación II.2 (Figura II.12) obteniendo un valor de $k_{+b} = 1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, similar al obtenido para el receptor 5-HT_{3A}-AC, lo que confirma la acción de 5-HT como bloqueador del canal. En los histogramas de cierre obtenidos para estos registros, se pudo observar la aparición de un nuevo componente, el cual correspondería al tiempo de cierre debido al bloqueo del canal (OB en el Esquema II.1). El valor de dicho tiempo fue de $\sim 15 \mu\text{s}$, el cual, en base al Esquema II.1,

corresponde a una velocidad de desbloqueo (k_{-b}) de $\sim 60.000 \text{ s}^{-1}$. De esta manera confirmamos que, efectivamente, el componente de cierre debido al bloqueo por 5-HT en los histogramas obtenidos para el receptor 5-HT_{3A}-AC coincide con los componentes de cierre que pertenecen al *burst* (C_B y C_I), y por ello no se observa su aparición en los histogramas de cierre.

Según lo reportado por Neher y Steinbach (Neher y Steinbach, 1978), en base al esquema simplificado para el bloqueo del canal (Esquema II.1), asumiendo que el canal no puede cerrarse o desensibilizarse a partir del estado bloqueado, y que la transición $O \leftrightarrow OB$ es rápida en comparación con la transición $O \leftrightarrow C$, la única vía por la cual el canal puede regresar desde el estado OB hacia el abierto O es por medio de la transición $OB \rightarrow O$ representada por la velocidad k_{-b} . Una vez allí tendría la posibilidad de cerrarse dando fin a un *burst*. En base estas restricciones, el tiempo de duración del *burst* (τ_{burst}) aumentaría en forma proporcional a la concentración del bloqueador debido al aumento de la velocidad de la transición $O \rightarrow OB$ con el aumento de la concentración de agonista, lo que disminuiría la probabilidad de que el receptor se cierre ($O \rightarrow C$). Este fenómeno estaría representado por la siguiente ecuación (Neher y Steinbach, 1978):

$$\tau_{burst} = (\alpha)^{-1} (1 + k_{+b}[5\text{-HT}] / k_{-b}) \quad \text{Ecuación II.3}$$

Donde τ_{burst} es directamente proporcional a la concentración del bloqueador (5-HT). Sin embargo, en forma concomitante con la reducción del tiempo O_L observamos una reducción en la duración del *burst* y del *cluster* (Figura II.13) en función de la concentración de 5-HT. Esto podría ser debido a que el receptor se cierra o desensibiliza desde el estado bloqueado OB llegando así a un estado cerrado-bloqueado CB, o cerrado-desensibilizado CD (CB-CD) (Esquema II.2), donde γ y δ son las velocidades con las que el canal se aleja y retorna al estado OB, respectivamente.

Otra explicación para los resultados observados, consideraría la presencia de otro tipo de bloqueo más lento, el cual se hace evidente a altas concentraciones de 5-HT y que producen el bloqueo del canal durante

un tiempo prolongado provocando la finalización del *burst* y por consiguiente del *cluster* (Esquema II.3). Para este caso, k_{+bL} y k_{-bL} corresponden a las velocidades de bloqueo y desbloqueo para dicha transición. Un esquema similar fue propuesto anteriormente para el receptor homopentamérico de baja conductancia 5-HT_{3A} (Hapfelmeier *et al.*, 2003).

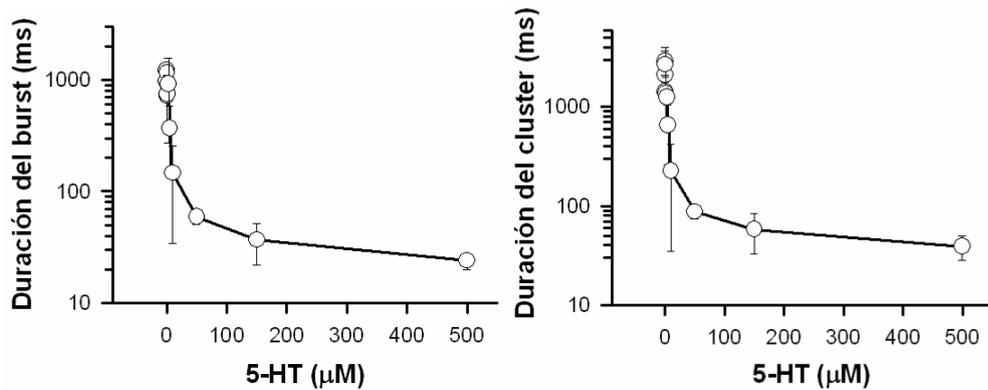
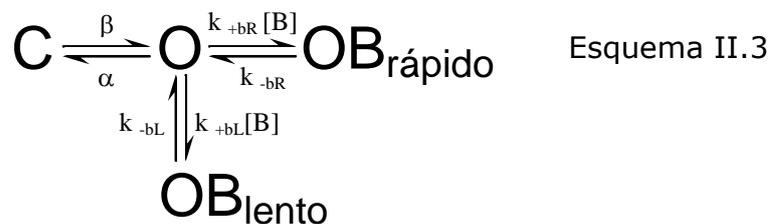
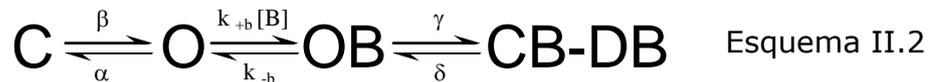


Figura II.13: Reducción de los tiempos de *burst* y *cluster* en función de la concentración de 5-HT.



Como mencionamos anteriormente, el número de aperturas por *cluster* se reduce a medida que aumenta la concentración de 5-HT (Tabla II.1). Si bien se esperaría un aumento en el número de eventos que pertenecen a un *cluster* debido al fenómeno de bloqueo rápido, la reducción en la duración del tiempo de duración del *cluster* produce la disminución del número de eventos dentro de este (Figura II.14). Sin embargo, a concentraciones elevadas de 5-HT (superiores a 50 μM) comienza a observarse *flickering* en los eventos de canal único, y por lo tanto un aumento en el número de aperturas por *cluster* (Figura II.14).

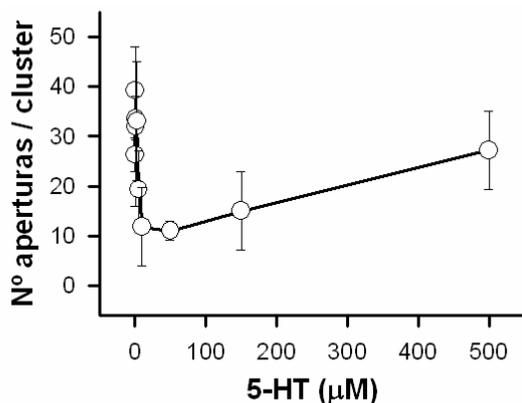


Figura II.14: Número de eventos por *cluster*.

Se observa que en un primer momento el N° de aperturas por *cluster* disminuye con la concentración de agonista. A concentraciones superiores a 100 µM de 5-HT se observa un aumento de los eventos dentro del *cluster* debido a *flickering*.

De esta forma confirmamos y caracterizamos el bloqueo del canal provocado por el propio agonista. Este bloqueo presentó un comportamiento peculiar, el cual puede interpretarse a la luz de los esquemas II.2 y II.3 propuestos.

Una importante diferencia observada entre los registros de corrientes macroscópicas y los de canal único, es que en las corrientes el fenómeno de bloqueo, el cual se debería al bloqueo lento del canal, se presenta a concentraciones superiores a 5 µM de 5-HT. En cambio, en los registros de canal único, ya a 5 µM de 5-HT se observa reducción del tiempo de estado abierto O_L , el cual sería debido al bloqueo rápido del canal.

II.1.2) Activación del 5-HT_{3A}R por 2-metil-serotonina (2-Me-5HT).

2-metil-serotonina (2-Me-5HT) es un agonista parcial del receptor 5-HT_{3A}, y debido a su alta especificidad, ha sido ampliamente utilizado para la identificación y caracterización de estos receptores en varios tejidos (Bradley *et al.*, 1986; Maricq *et al.*, 1991; Hussy *et al.*, 1994).

Con el fin de estudiar el perfil de activación generado por este agonista y contrastar el comportamiento del receptor de alta conductancia respecto del receptor salvaje, analizamos corrientes macroscópicas y registros de canal único del receptor 5-HT_{3A}-AC activado por 2-Me-5HT.

Corrientes macroscópicas.

Las corrientes macroscópicas obtenidas en configuración *outside-out* a distintas concentraciones de 2-Me-5HT mostraron una lenta velocidad de activación seguida de una lenta caída en presencia constante del agonista (Figura II.15). La curva de activación en función de la concentración de 2-Me-5HT mostró un $EC_{50} = 15 \pm 6 \mu\text{M}$ y un coeficiente de Hill de $1,2 \pm 0,5$ (Figura II.15). La corriente máxima alcanzó un 40% respecto de la obtenida con 5-HT.

Estos resultados se corresponden con los esperados para la acción de un agonista parcial, y fueron similares a los reportados previamente para el receptor homopentamérico salvaje (Hussy *et al.*, 1994; Mott *et al.*, 2001).

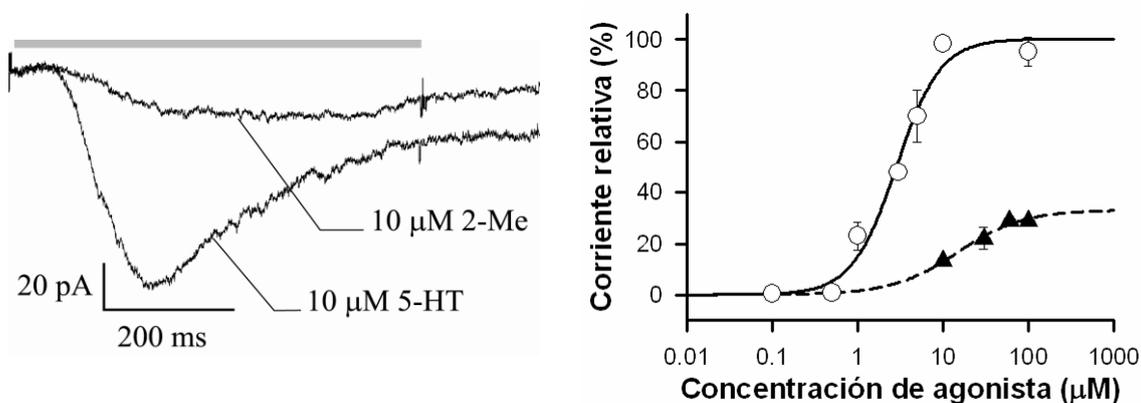


Figura II.15: Activación del $5\text{-HT}_{3A}\text{R-AC}$ por 2-Me-5HT.

Izquierda: Registros de corrientes macroscópicas obtenidas a una misma concentración de 5-HT o 2-Me-5HT. *Derecha:* Curvas dosis-respuesta obtenidas a partir de la activación del receptor a distintas concentraciones de 5-HT (○) o 2-Me-5HT (▲).

Registros de canal único.

A diferencia de los registros de corrientes macroscópicas, que solo muestran el grado de eficiencia de un agonista, los registros de canal único permiten identificar las bases por las que dicho agonista actúa en forma parcial.

Cuando realizamos registros de canal único activando con 2-Me-5HT, observamos un comportamiento similar al obtenido con 5-HT. La menor concentración a la que pudimos observar eventos fue $0,5 \mu\text{M}$ (5 veces mayor que la necesaria para activar al receptor con 5-HT). A esta concentración el receptor se activa con una muy baja frecuencia pero de manera similar a la que presenta a mayores concentraciones. Dicho comportamiento fue similar al que describimos para el receptor cuando es activado por $0,1 \mu\text{M}$ de 5-HT.

Las concentraciones evaluadas para este agonista variaron entre $0,5$ - $50 \mu\text{M}$. En todos los casos se observaron eventos sucesivos de aperturas separadas por cierres breves (*bursts*). Dichos *bursts* pueden aparecer aislados o agrupados conformando *clusters*. Los histogramas de estado abierto ajustaron con tres componentes, pero de valores diferentes a los obtenidos con 5-HT, siendo de $\sim 150 \mu\text{s}$, 1 - 2 ms , y uno mayoritario de $\sim 17 \text{ ms}$, para los estados abierto O_B , O_I y O_L , respectivamente. Cabe destacar que estos valores corresponden a concentraciones entre $0,5$ - $1 \mu\text{M}$ de agonista, ya que a concentraciones superiores se observó una notable reducción del tiempo de estado abierto O_L . A $50 \mu\text{M}$ de 2-Me-5HT los histogramas ajustaron con dos componentes de $\sim 90 \mu\text{s}$ y $\sim 1 \text{ ms}$ (Tabla II.3). Este efecto es posiblemente debido a la acción del agonista como bloqueador de canal abierto, similar a lo demostrado para 5-HT. Los histogramas de tiempos de estado cerrado no mostraron diferencia respecto a los obtenidos con 5-HT, ajustando con seis componentes, cuyas áreas y duraciones fueron similares a los observados al activar con 5-HT. Aquí, una vez más, tampoco observamos una clara dependencia entre la concentración de agonista y la cinética de activación del receptor (Figura II.16). Además de la reducción en la duración del tiempo de apertura O_L , se observa una reducción en la duración del *cluster*, siendo de 330 ms y 15 ms a 1 y $30 \mu\text{M}$ de 2-Me-5HT, respectivamente (Figura II.16).

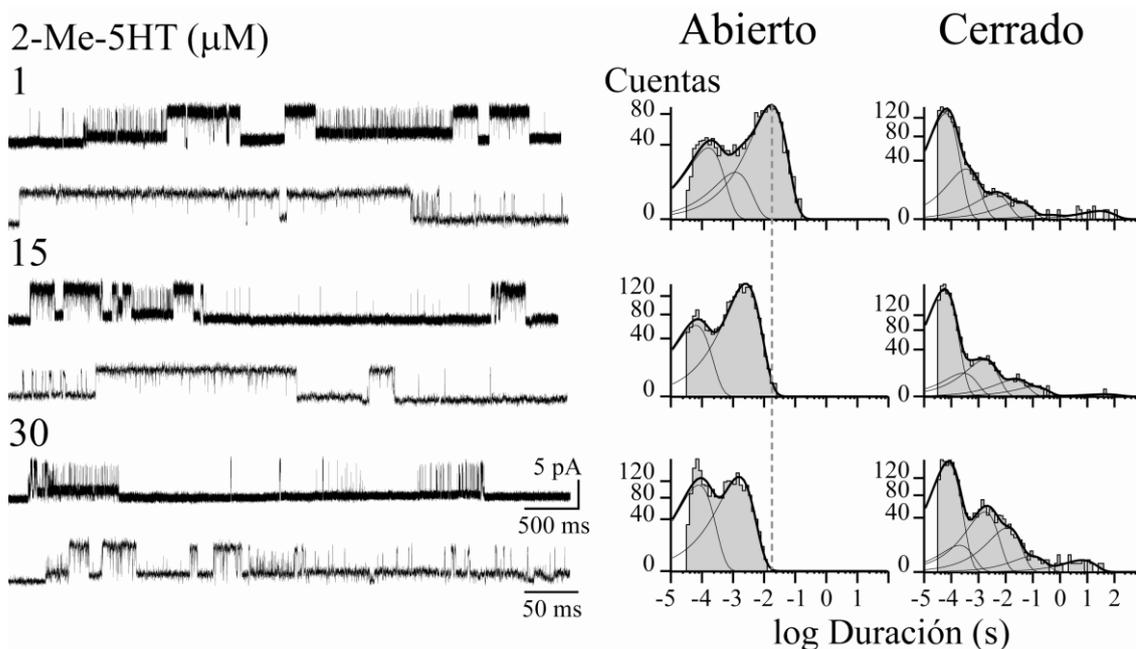


Figura II.16: Activación del receptor 5-HT_{3A}-AC a distintas concentraciones de 2-Me-5HT. *Izquierda:* Registros de canal único mostrados a dos escalas temporales. *Derecha:* Histogramas de los tiempos de apertura y cierre obtenidos a partir de dichos registros. Potencial de membrana -70 mV, filtro 10 kHz.

[2Me]	O _L (ms) (área)	O _I (ms) (área)	O _B (ms) (área)	C _L (ms) (área)	C _I (ms) (área)	C _B (ms) (área)
1	16,8 ± 1,8 0,62 ± 0,14	1,0 ± 0,1 0,15 ± 0,06	0,12 ± 0,04 0,25 ± 0,09	2,5 ± 1,0 0,07 ± 0,06	0,21 ± 0,10 0,11 ± 0,06	0,05 ± 0,01 0,75 ± 0,15
15	4,2 ± 1,2 0,73 ± 0,04	--- ---	0,08 ± 0,01 0,27 ± 0,04	1,6 ± 0,5 0,09 ± 0,02	0,25 ± 0,07 0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,01 0,80 ± 0,02
30	1,5 ± 0,1 0,53 ± 0,02	--- ---	0,07 ± 0,01 0,47 ± 0,02	1,7 ± 0,5 0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,01 0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,01 0,56 ± 0,09

Tabla II.3: Activación del receptor 5-HT_{3A}-AC por 2-Me-5HT. Valores obtenidos a distintas concentraciones de 2-Me-5HT. Los datos corresponden a los tiempos de estado abierto y cerrado que conforman un *cluster*. Los valores son expresados como la media ± desvío estándar de al menos tres registros para cada concentración.

Bloqueo del canal por 2-Me-5HT.

Activando el receptor 5-HT_{3A}-AC con distintas concentraciones de 2-Me-5HT obtuvimos registros de canal único y observamos una reducción del tiempo de estado abierto O_L dependiente de la concentración de agonista (Figura II.16). Al graficar la inversa del tiempo O_L en función de la concentración de 2-Me-5HT obtuvimos una relación lineal (Figura II.17), la cual ajustó correctamente con la ecuación II.2. De esta manera confirmamos que la reducción del tiempo O_L se debe a un bloqueo rápido del canal, cuyo valor de k_{+b} fue de $16 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, indicando que además de agonista, es un bloqueador 10 veces más potente que 5-HT. A partir de los histogramas de tiempos cerrados observamos un aumento del área del componente C_L en función de la concentración de 2-Me, lo que indicaría que el tiempo C_L coincide con el tiempo de cierre producido por el bloqueo del canal (Tabla II.3). Este tiempo de bloqueo se corresponde con una velocidad de desbloqueo de $\sim 500 \text{ s}^{-1}$ (Figura II.17, Tabla II.3).

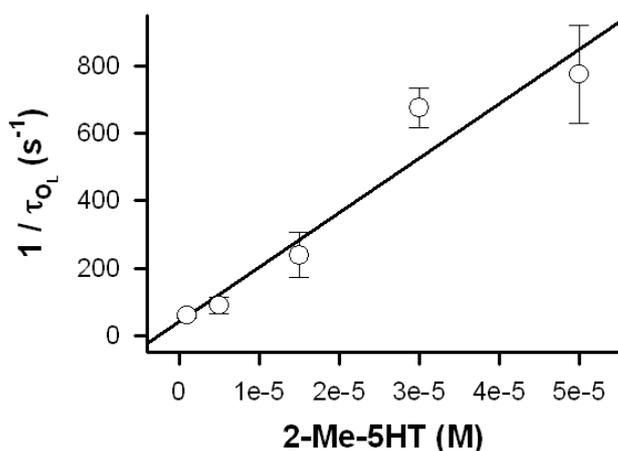


Figura II.17: Bloqueo del receptor 5-HT_{3A} debido a 2-Me-5HT. La relación lineal confirma que la reducción en el tiempo O_L es debido al bloqueo del poro del receptor.

En conclusión, combinando corrientes macroscópicas con registros de canal único, corroboramos que 2-Me-5HT actúa como agonista parcial y definimos además, las bases de su baja efectividad.

II.1.3) Cinética de activación del receptor 5-HT_{3A}-AC.

Un avance importante en el conocimiento de los mecanismos de activación del receptor 5-HT_{3A} sería obtener un modelo cinético que apoye las observaciones experimentales y que permita interpretar mejor los efectos provocados por la acción de drogas que lo modulen o mutaciones que afecten su funcionamiento.

El receptor de ACh ha sido el modelo de estudio para todos los miembros de esta familia de receptores. Su cinética de activación, desactivación y desensibilización ha sido estudiada por años y muchos de sus mecanismos se conocen en detalle actualmente. Sin embargo, para los receptores homopentaméricos pertenecientes a esta familia no se ha logrado todavía un esquema que represente adecuadamente su cinética. Los más estudiados hasta el momento, y para los cuales se han postulado ciertos esquemas, han sido los receptores homoméricos de glicina (Beato *et al.*, 2004; Burzomato *et al.*, 2004; Colquhoun y Sivilotti, 2004), el receptor de ACh $\alpha 7$ (Papke *et al.*, 2000; Mike *et al.*, 2000) y la quimera $\alpha 7$ -5HT₃ (Rayes *et al.*, 2005).

Los esquemas cinéticos que se encuentran en la literatura para el receptor homopentamérico 5-HT_{3A} están contruidos sobre las bases de resultados experimentales obtenidos solo a partir de corrientes macroscópicas, ya que la baja conductancia del canal impedía su estudio a nivel de canal único (Mott *et al.*, 2001; Solt *et al.*, 2007). Con la utilización del receptor de alta conductancia buscamos entonces definir un esquema cinético que pueda representar de manera apropiada el comportamiento del receptor en base a los resultados hasta ahora mencionados en este trabajo.

Esquema cinético.

Como vimos a nivel de canal único, la principal forma de activación del receptor 5-HT_{3A}-AC es en *bursts*, los cuales pueden aparecer aislados o 2 a 3 de ellos agrupados formando largos trazos de activación, lo que constituye un *cluster*. Dentro de cada *burst* se distinguen tres tipos de aperturas separadas por dos cierres muy breves. A su vez, dentro de un

cluster, cada *burst* se encuentra separado del adyacente por un tiempo de cierre mayor que aquellos que pertenecen al *burst*. Por lo tanto, concluimos que un *cluster* está compuesto por tres tipos de aperturas y tres tipos de cierres, dos de los cuales pertenecen al *burst* (*intra-burst*), y un tercero más largo que separa los *bursts* que conforman el *cluster* (*inter-burst*) (Tabla II.2) (Figura II.18).

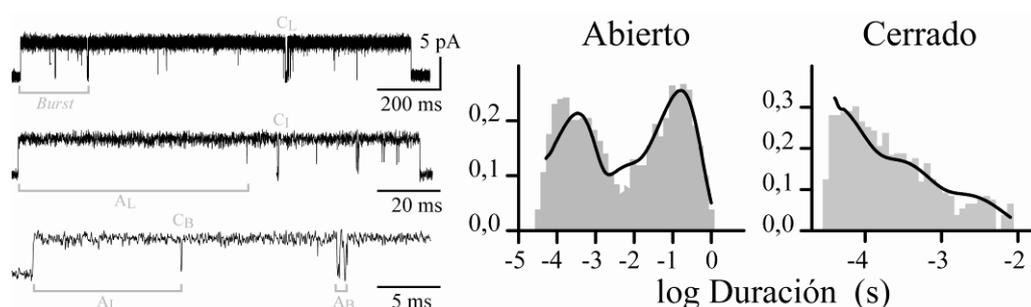


Figura II.18: Activación a nivel de canal único.

Izquierda: Trazos que muestran los tiempos de estado abierto y cerrado que pertenecen al *cluster*. *Derecha:* Histogramas para los eventos de cierre y apertura que conforman el *cluster*.

Exceptuando el fenómeno de bloqueo, que ocurre a concentraciones de 5-HT superiores a $3 \mu\text{M}$, los tiempos que conforman el *cluster* no se ven modificados en base a la concentración de agonista, por lo que la cinética dentro del *cluster* no estaría relacionada con el número de moléculas de agonista unidas. Es decir, una vez que el receptor une la cantidad de moléculas de agonista necesarias para la máxima activación, fluctúa entre los distintos estados abierto y cerrado para conformar un *burst* y/o un *cluster* hasta finalizar dicha activación por desensibilización (Bouzat *et al.*, 2008).

Para realizar un análisis cinético que nos permita inferir un modelo cinético y sus respectivas velocidades para cada transición, obtuvimos registros de canal único activados por 0,5; 1 y $3 \mu\text{M}$ de 5-HT. Utilizamos estas concentraciones para evitar el bloqueo del canal, como demostramos inicialmente. De esta manera observamos que los tiempos de estado abierto y cerrado (Tabla II.4), y la duración del *burst* y del *cluster* (700 y 1.400 ms respectivamente) presentan tiempos de duración similares a

todas las concentraciones evaluadas. Los eventos obtenidos fueron analizados y seleccionados en base a la distribución de los tiempos que conforman los *bursts* y los *clusters* para asegurar la homogeneidad de los datos. Solo fueron considerados *bursts* y *clusters* conformados por al menos cinco eventos de apertura (ver Metodología).

Los valores observados para los tiempos de cierre y apertura luego de la selección, y que por lo tanto pertenecen exclusivamente al *cluster*, son similares a los obtenidos a partir de los registros completos (Tablas II.2 y II.4). A partir del análisis de los *clusters* seleccionados, solo se evidencia un aumento significativo en el área del componente O_L acompañado por una disminución en el área del componente O_B respecto del análisis de los registros completos (Tabla II.2). Esto indicaría que varias de las aperturas breves se encuentran como eventos aislados, como puede confirmarse al observar los registros y los histogramas de la Figura II.9. Dichos eventos aislados no fueron considerados para este análisis cinético.

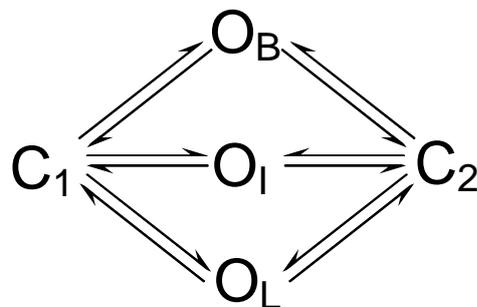
[5-HT]	O_L (ms) (área)	O_I (ms) (área)	O_B (ms) (área)	C_L (ms) (área)	C_I (ms) (área)	C_B (ms) (área)
0,5	110 ± 16	$2,1 \pm 1,5$	$0,20 \pm 0,04$	$1,5 \pm 0,8$	$0,19 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,01$
	$0,55 \pm 0,30$	$0,14 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,12$	$0,78 \pm 0,12$
1	118 ± 6	$1,6 \pm 0,9$	$0,17 \pm 0,02$	$2,3 \pm 0,6$	$0,19 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,01$
	$0,55 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,11$	$0,05 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,08$	$0,68 \pm 0,09$
3	131 ± 10	$6,0 \pm 2,7$	$0,20 \pm 0,09$	$1,7 \pm 0,7$	$0,18 \pm 0,10$	$0,02 \pm 0,01$
	$0,63 \pm 0,10$	$0,16 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,07$	$0,04 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,05$	$0,86 \pm 0,06$

Tabla II.4: Valores de los tiempos de estado abierto y cerrado que componen los *clusters*. Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar de al menos tres registros para cada concentración.

Existen diversas combinaciones en las que tres estados cerrado y tres abierto pueden organizarse para conformar un esquema cinético. Para generar un modelo que pueda representar la cinética de activación de este receptor realizamos una inspección visual de los eventos de canal único a partir de distintos registros para determinar si existe algún patrón en particular en el que estos eventos se disponen entre sí. Pudimos observar que no existe una correlación clara entre los eventos, es decir, todos ellos aparecen interconectados. El receptor, a partir de un estado cerrado inicial,

puede abrirse hacia cualquiera de los tres estados abierto y desde allí cerrarse hacia cualquiera de los dos cierres pertenecientes al *burst* (C_B y C_I). El tiempo de cierre C_L solo aparece separando *bursts* que conforman un *cluster*, por lo que este sería el tiempo que el receptor tarda en volver a activarse una vez finalizado el *burst* (Figuras II.9 y II.18).

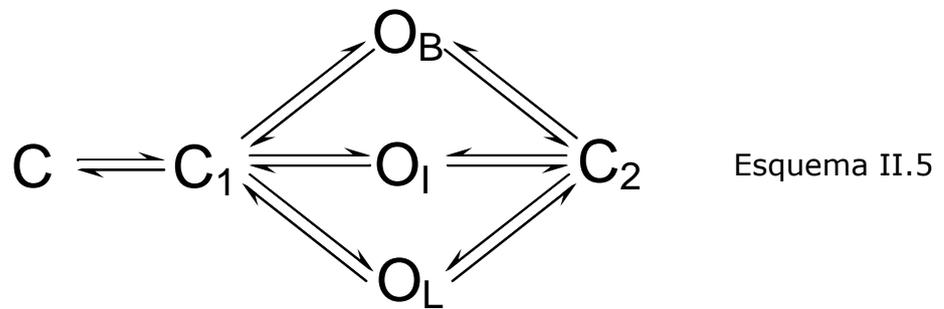
Un esquema lineal no podría explicar correctamente estas observaciones, ya que condicionaría al receptor a pasar a través de ciertos estados en forma consecutiva. Por lo tanto consideramos un esquema cíclico para la activación que conforma un *burst* (Esquema II.4), donde C_1 y C_2 representan los cierres, y O_I , O_B y O_L las aperturas intermedias, breves y largas, respectivamente. Un esquema similar fue propuesto anteriormente para el receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃ (Rayes *et al.*, 2005), así como también para receptores NMDA (Banke y Traynelis, 2003; Auerbach y Zhou, 2005).



Esquema II.4

Para analizar el punto desde donde el receptor inicia su activación, realizamos una inspección visual de 38 *bursts* para evaluar cuál es el primer evento que ocurre dentro del *burst*. De este análisis observamos que ~60% de los *bursts* comienzan y finalizan con un evento O_L , ~30% con un O_I , y ~10% con un O_B . Esto indicaría que el punto de ingreso del receptor al ciclo debe permitirle abrirse con mayor predisposición hacia O_L , pero también dando la posibilidad de hacerlo hacia cualquiera de los demás estados abierto, por lo que consideramos dicho ingreso a través de uno de los estados cerrado del modelo (Esquema II.5). Para ello conectamos un nuevo estado cerrado, C , con uno de los estados cerrado del ciclo (C_1 por

ejemplo), donde C sería el punto inicial desde donde el receptor se activa para conformar un *burst*, dicho *burst* finaliza cuando el receptor se desensibiliza o cuando se cierra hacia el estado C teniendo la posibilidad de volver a activarse para conformar otro *burst*, y de esta manera dar lugar a un *cluster*.



Para definir a qué tipo de cierre corresponde cada estado C, C_1 y C_2 del esquema II.5, utilizamos el programa MIL (del programa QuB) para realizar el análisis cinético de los registros experimentales en base al esquema postulado (ver Metodología). Observamos que el esquema representa fielmente el comportamiento del receptor, debido al correcto ajuste de los histogramas experimentales por las curvas de densidad teóricas (Figura II.19).

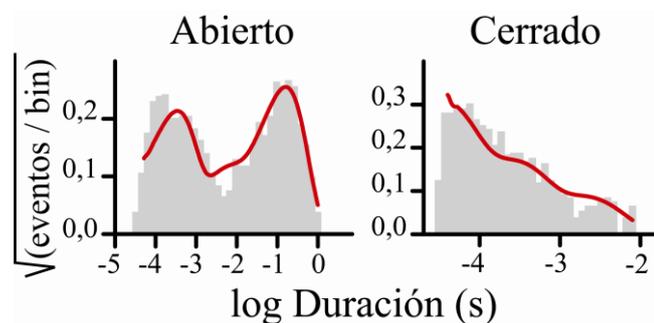
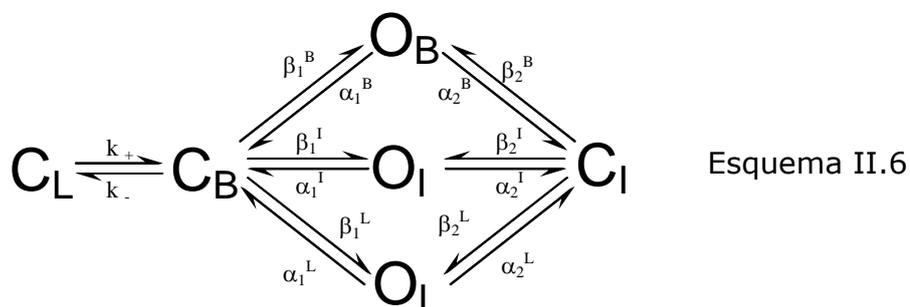


Figura II.19: Ajuste de las curvas teóricas a los histogramas experimentales en base al modelo propuesto en el esquema II.5.

En base a las velocidades obtenidas para cada transición (Tabla II.5), y en vista de la frecuencia de aparición de cada evento al inicio de cada *burst*, definimos la distribución de cada estado de la siguiente manera (Esquema II.6):



Este esquema representa la activación de un *cluster* del receptor, y a partir de las velocidades de cada transición observamos que una vez que el receptor alcanza el estado C_B puede abrirse hacia el estado O_L con una frecuencia $\sim 60\%$, hacia O_I $\sim 30\%$, y hacia O_B $\sim 10\%$, lo que concuerda con las proporciones observadas experimentalmente.

Esquema II.6		
k_+	530 ± 35	s^{-1}
k_-	2.200 ± 165	s^{-1}
β_1^B	4.150 ± 500	s^{-1}
α_1^B	1.530 ± 110	s^{-1}
β_1^I	8.600 ± 950	s^{-1}
α_1^I	275 ± 60	s^{-1}
β_1^L	25.540 ± 1.270	s^{-1}
α_1^L	$15 \pm 0,7$	s^{-1}
β_2^B	4.500 ± 200	s^{-1}
α_2^B	3.310 ± 190	s^{-1}
β_2^I	240 ± 100	s^{-1}
α_2^I	20 ± 10	s^{-1}
β_2^L	$0,4 \pm 0,3$	s^{-1}
α_2^L	$0,3 \pm 0,1$	s^{-1}

Tabla II.5: Velocidades correspondientes al esquema cinético de activación del *cluster*. Las velocidades fueron obtenidas a partir del ajuste de las curvas teóricas calculadas en base al esquema II.6 sobre los histogramas experimentales para al menos tres registros obtenidos a concentraciones inferiores a $5 \mu\text{M}$ de 5-HT (Figura II.19). Sus valores se expresan como la media \pm error estándar.

Otros esquemas posibles fueron tomados en consideración, en los cuales los tres estados abiertos y los tres cerrados se conectaron de diferente manera generando modelos lineales. Ninguno de estos esquemas logró representar de manera adecuada los resultados experimentales como el aquí propuesto. Esto fue discriminado siguiendo el criterio de máxima similitud calculada por el programa, y evaluando también la posibilidad de dichos esquemas de representar las secuencias de aparición de eventos de apertura y cierre observados en los registros de canal único.

Para generar un esquema completo de activación del receptor es necesario determinar los pasos previos y posteriores a la activación del *burst*.

El primer inconveniente que se presenta es la determinación del número de moléculas que serían necesarias para provocar la apertura del canal. En vista de que se trata de un receptor homopentamérico, este puede unir desde 1 hasta 5 moléculas de agonista. Esto genera una gran incógnita al momento de definir el esquema cinético completo, ya que es necesario determinar el número de pasos de asociación y disociación previos a la activación.

A partir de la inspección de las corrientes macroscópicas, pudimos observar que su activación, evaluada a todas las concentraciones de agonista utilizadas, mostró un perfil sigmoideo (Figura II.20). Esto estaría indicando la necesidad de unir más de una molécula de agonista para lograr la apertura del receptor (Clements y Westbrook, 1991; Clements *et al.*, 1998; Legendre P., 1998). Al normalizar las corrientes obtenidas a 3 y 10 μM de 5-HT, observamos que la cinética de activación es la misma en ambos casos, apoyando de esta manera la observación de que cinéticamente la activación del receptor no es dependiente de la concentración de agonista (Figura II.20).

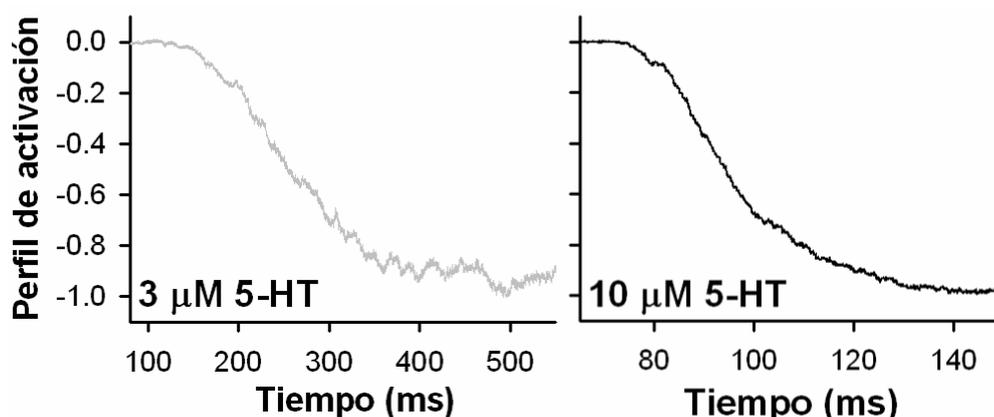


Figura II.20: Fase de activación las corrientes normalizadas obtenidas a partir del receptor 5-HT_{3A}-AC a las concentraciones de 5-HT indicadas.

Según lo propuesto para otros receptores, el grado de sigmoicidad de la fase de activación de la corriente es indicio del número de moléculas de agonista necesarias para producir la apertura del canal (Legendre P., 1998). Por lo tanto, al presentar el mismo grado de sigmoicidad a las dos concentraciones de 5-HT evaluadas, estas corrientes estarían confirmando que en ambos casos la activación se produce luego de la unión de un mismo número de moléculas de agonista, el cual puede inferirse a partir de la siguiente ecuación (van Hooft y Vijverberg, 1996):

$$I_{act}(t) = a \times [1 - \exp(-t / \tau_{act})]^n \quad \text{Ecuación II.4}$$

Donde I_{act} es la corriente medida (pA) a un determinado tiempo t (ms), a es la amplitud máxima, τ_{act} es la constante de activación, y n es el grado de sigmoicidad. Del ajuste de la fase de activación de las corrientes activadas a 3 y 10 μM de 5-HT obtuvimos valores de $n \approx 3$ (Figura II.21).

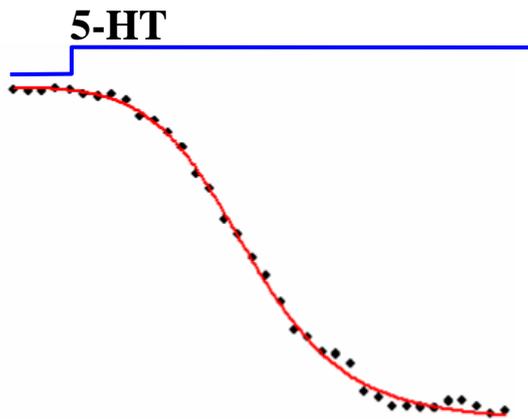


Figura II.21: Fase de activación de una corriente obtenida en configuración *outside-out* activada por $3 \mu\text{M}$ de 5-HT (puntos) y ajustada a la ecuación II.3 (línea roja), a partir de la cual obtuvimos un valor de $n = 3,0 \pm 0,6$ ($r^2 = 0,9$).

Otro parámetro importante a tener en cuenta, es la determinación de la cinética de recuperación del receptor una vez que este se ha desensibilizado. Esto brinda información acerca de las vías a través de las cuales el receptor se recupera desde el estado desensibilizado y da idea de los pasos dependientes de agonista involucrados en dicha recuperación.

Para ello realizamos un **protocolo de doble pulso**, activando con tiempos de exposición al agonista prolongados para provocar la desensibilización del receptor y tiempos variables entre pulsos (ver Metodología). De esta manera obtuvimos las curvas de recuperación en función del tiempo entre pulsos para corrientes macroscópicas activadas por 3 ó $10 \mu\text{M}$ de 5-HT (Figura II.22).

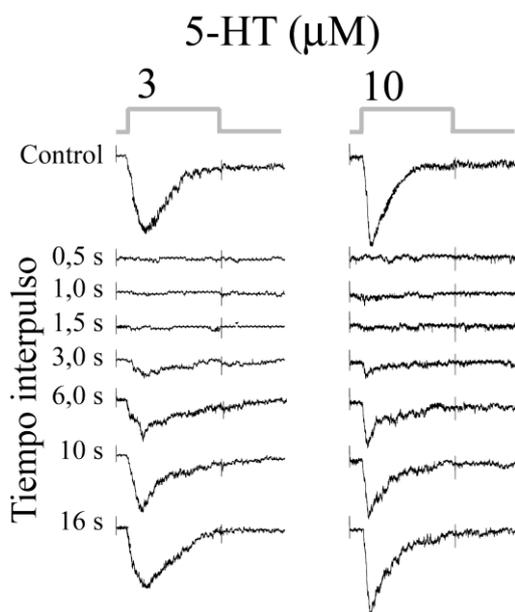
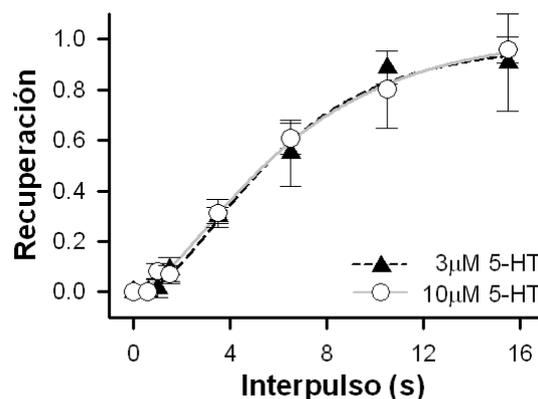


Figura II.22: Recuperación a partir de la desensibilización.

Izquierda: Registros de corrientes macroscópicas obtenidas para 3 y $10 \mu\text{M}$ de 5-HT mediante un protocolo de doble pulso a los intervalos de tiempo indicados. *Abajo:* Ajuste de los valores experimentales a la ecuación II.3.



Como podemos observar, la cinética de recuperación del receptor muestra un comportamiento sigmoideo, siendo idéntica para ambas concentraciones. Este resultado sugiere un mecanismo de recuperación desde el estado desensibilizado (D) hasta el estado de reposo activable (R) compuesto por más de un paso de transición: $A_n D \rightarrow [\dots]_{n-1} \rightarrow R$ (van Hooft y Vijverberg, 1996; Mott *et al.*, 2001; Solt *et al.*, 2007). Para conocer el número de pasos implicados y la velocidad para dichas transiciones, ajustamos los datos experimentales a la siguiente ecuación (van Hooft y Vijverberg, 1996):

$$I_{\text{rec}}(t) = a \times [1 - \exp(-t / \tau_{\text{rec}})]^n \quad \text{Ecuación II.5}$$

Donde I_{rec} es la corriente medida (pA) a un determinado tiempo t (s), τ_{rec} es el tiempo necesario para que la corriente se recupere el 50% respecto del pulso control, y n indica cuan sigmoidea es la curva. Para ambas concentraciones, los valores obtenidos para dichas variables no mostraron diferencias significativas, siendo τ_{rec} y n de $3,7 \pm 0,9$ s y $2,7 \pm 0,7$; y $4,4 \pm 0,6$ s y $2,2 \pm 0,3$ para 3 y 10 μM de 5-HT, respectivamente ($r^2 = 0.99$ para ambos casos).

Modelo cinético.

Por lo tanto, considerando en conjunto lo obtenido hasta el momento, es posible construir un modelo que represente la cinética del receptor 5-HT_{3A}. Para ello consideramos lo siguiente:

- 1) El receptor de acetilcolina (AChR), ancestro común del receptor 5-HT₃, requiere la unión de una o dos moléculas de ACh para abrir el canal. Esto indicaría (por homología) que posiblemente no es necesaria la ocupación de los cinco sitios disponibles del receptor homomérico 5-HT_{3A} para provocar su apertura.
- 2) De la curva dosis-respuesta construida a partir de las corrientes macroscópicas obtuvimos, al igual que otros autores, un valor del coeficiente de Hill ~ 2 .

- 3) La activación de las corrientes macroscópicas muestra a todas las concentraciones evaluadas un perfil sigmoideo, lo que indica la necesidad de unir más de una molécula de agonista para provocar la apertura del canal.
- 4) Del ajuste del perfil de activación de las corrientes macroscópicas obtuvimos un valor de sigmoidicidad ≈ 3 .
- 5) La curva de recuperación de la activación del receptor desde la desensibilización mostró un comportamiento sigmoideo, con un coeficiente de sigmoidicidad ≈ 3 .

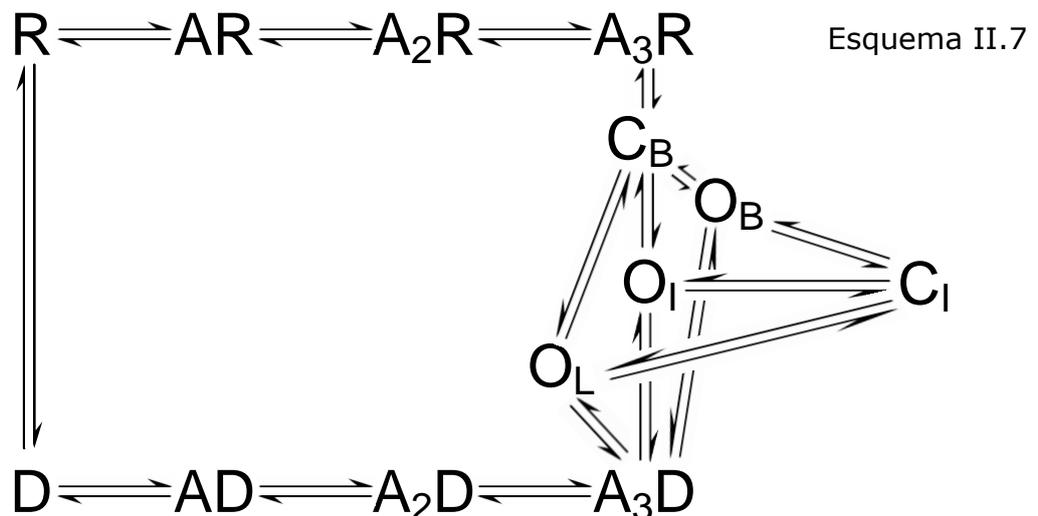
Por lo tanto, en base a las observaciones enumeradas, proponemos un esquema cinético donde el receptor se abre a partir de la unión de 3 moléculas de agonista. En vista de que los tiempos que conforman un *cluster* no mostraron dependencia con la concentración de agonista, sugerimos que una vez que el receptor ha unido las 3 moléculas de agonista necesarias (A_3R), debe superar una barrera energética (k_+) hasta alcanzar un estado activable (C_B en el esquema II.6). Este estado cerrado adicional desde donde el receptor puede pasar hacia un estado cerrado capaz de ser activado ya ha sido propuesto por otros autores para los receptores de glicina tanto homoméricos como heteroméricos, denominando dicha transición “*flip*” (Burzomato *et al.*, 2004; Colquhoun y Sivilotti, 2004; Erreger *et al.*, 2005; Lape *et al.*, 2008) (ver Introducción).

Sin embargo, existen en baja proporción eventos aislados de aperturas breves que corresponden al componente O_B , los cuales no pertenecen al *cluster*. Por lo tanto, no descartamos la posibilidad de que el receptor pueda abrirse a partir de estados intermedios de ocupación, es decir, al unir una o dos moléculas de agonista. Este tipo de eventos presentaría propiedades cinéticas diferentes respecto a las discutidas hasta el momento, y serían excluidos al realizar la selección de los *clusters* para el análisis cinético (Tabla II.2).

El esquema completo considera la unión de al menos 3 moléculas de agonista para alcanzar el estado de transición a través del cual ingresa en el ciclo que lleva a la conformación del *burst* y con este del *cluster*. Luego de ello, el receptor concluye su activación principalmente por

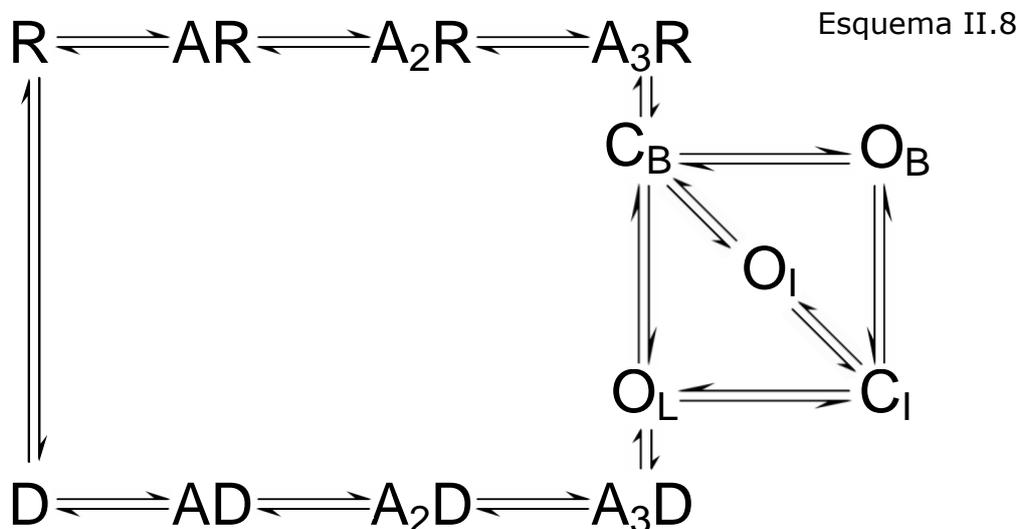
desensibilización (Bouzat *et al.*, 2008) y debe transitar a través de tres estados intermedios dependientes de la concentración de agonista hasta llegar al estado de reposo inicial. Estos estados de transición entre el estado desensibilizado y el de reposo serían los pasos de liberación secuencial de cada una de las moléculas de agonista: $A_3D \rightarrow A_2D \rightarrow AD \rightarrow D \rightarrow R$.

De la inspección visual de los *bursts* y *clusters* observamos que estos pueden finalizar desde cualquiera de los tres tipos de aperturas, siendo más probable la apertura O_L como el último evento perteneciente al *burst* (Figura II.19). Otra posibilidad sería suponer que el receptor se desensibiliza desde alguno de sus estados cerrados C_B o C_I . Sin embargo, en vista de que el tiempo que el receptor permanece en C_B o C_I es tan breve, no daría al *cluster* la posibilidad de desensibilizarse, provocando trazos de activación extremadamente largos. Por lo tanto, consideramos que el receptor se desensibiliza desde cualquiera de sus estados abiertos, dando también de esta manera la posibilidad de finalizar cada *burst* y/o *cluster* desde cualquiera de los tres tipos de aperturas, como observamos tras la inspección de los registros de canal único (Esquema II.7).



Sin embargo, observamos experimentalmente que aproximadamente el 60% de los *bursts* termina con una apertura prolongada (O_L). Esto podría deberse a que al ser tan breves los otros estados abiertos (O_I y O_B), y muy

lenta la velocidad de desensibilización, es muy baja la probabilidad de que el *burst* finalice por desensibilización a partir de los estados O_I y O_B . Por lo tanto, el esquema II.7 puede simplificarse de la siguiente manera:



Para conocer las velocidades macroscópicas que componen este esquema, utilizamos los resultados obtenidos a partir de los registros de corrientes adquiridos en configuración *outside-out* a distintas concentraciones de agonista. A partir de estos datos observamos que la cantidad de corriente obtenida es dependiente de la concentración de agonista, mostrando a partir de la curva dosis-respuesta un EC_{50} de $2,7 \mu\text{M}$. A concentración saturante, la activación de las corrientes macroscópicas presentan una velocidad máxima, por lo que el único paso limitante para la activación sería la transición $A_3R \rightarrow C_B$ (Esquema II.8). Graficando la velocidad de activación en función de la concentración de agonista observamos que la curva alcanza un máximo a aproximadamente $100 \mu\text{M}$ de 5-HT (Figura II.23), cuya velocidad de activación es de $\sim 300 \text{ s}^{-1}$. Por lo tanto, consideramos dicho valor como la velocidad k_+ , la cual conecta los estados A_3R y C_B (Esquema II.8). Esta velocidad k_+ fue similar a la obtenida a partir del análisis cinético de los *clusters*, confirmando así dicho valor (Tabla II.6).

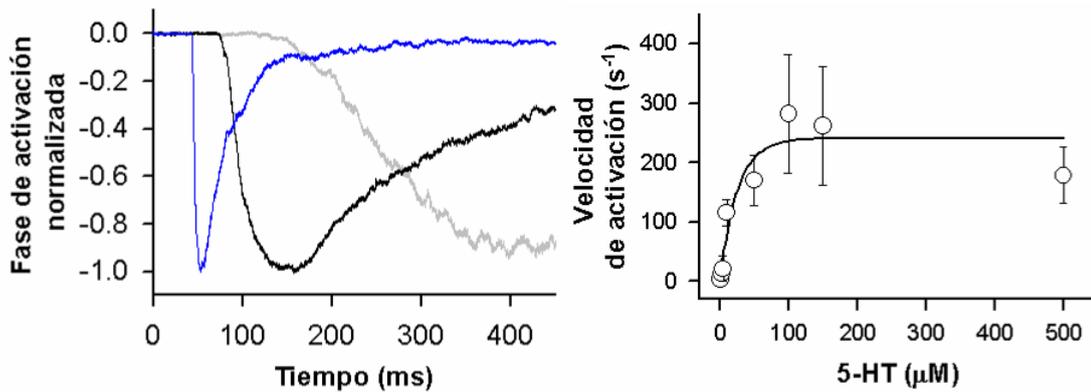


Figura II.23: Velocidad de activación del receptor.

Izquierda: Fases de activación de las corrientes macroscópicas normalizadas obtenidas en configuración *outside-out* a 3 (gris), 10 (negra) y 100 μM de 5-HT (azul). *Derecha:* Curva de la velocidad con la que las corrientes alcanzan la máxima activación a cada concentración de agonista. Esta velocidad fue obtenida en base al tiempo que la corriente tarda en alcanzar el 80% del pico final descartando el 20% de la fase inicial ($t_{20-80\%}$).

El tiempo de caída de las corrientes macroscópicas puede relacionarse con la velocidad de desensibilización a través de la siguiente ecuación (Dilger y Liu, 1992):

$$1 / \tau_d = (P_{\text{apertura}} \times k_{+d}) + k_{-d} \quad \text{Ecuación II.6}$$

Donde τ_d es el tiempo (s) que la corriente tarda en alcanzar el estado estacionario, P_{apertura} es la probabilidad de apertura del receptor a una determinada concentración de agonista, k_{+d} la velocidad de desensibilización, y k_{-d} la velocidad de recuperación desde la desensibilización. En general, las corrientes alcanzan el estado estacionario, siendo la corriente remanente $\leq 1\%$ luego de la caída por desensibilización, por lo que k_{-d} lo consideramos igual a $0,01 \text{ s}^{-1}$ (un valor prácticamente despreciable). Para los registros de canal único la P_{apertura} del receptor fue máxima a todas las concentraciones analizadas, con un valor cercano a 1. En vista de todo esto, podemos simplificar la ecuación II.6 para obtener la velocidad de desensibilización k_{+d} a partir del tiempo de caída de las corrientes macroscópicas, de la siguiente manera:

$$1 / \tau_d = k_{+d} \quad \text{Ecuación II.7}$$

Para evitar el bloqueo del canal producido por el agonista, consideramos la máxima velocidad de desensibilización a aquella obtenida a 3 μM de 5-HT. Este valor fue de 1,2 s^{-1} , definido como la velocidad k_{+d} . La velocidad de desensibilización del receptor puede ser obtenida también a partir de los registros de canal único (Auerbach y Akk, 1998), ya que se encuentra relacionada con la P_{apertura} y la duración del *cluster* a través de la siguiente ecuación:

$$(\tau_{\text{cluster}} \times P_{\text{apertura}})^{-1} = k_{+d} \quad \text{Ecuación II.8}$$

Debido a que la P_{apertura} es ~ 1 , y utilizando un tiempo de duración del *cluster* $\sim 1,4$ s, calculamos un valor de $k_{+d} \sim 0,7$ s^{-1} , el cual es similar al obtenido a partir de las corrientes macroscópicas.

A partir de los datos provenientes del protocolo de doble pulso, realizado para el análisis de recuperación del receptor desde la desensibilización, obtuvimos un valor de τ_{rec} de 3,7 s, cuya inversa aproxima al valor de la constante de disociación del agonista (k_3) desde el estado desensibilizado (van Hooft y Vijverberg, 1996; Solt *et al.*, 2007). El valor obtenido de k_3 fue de 0,27 s^{-1} , similar a lo reportado previamente (Solt *et al.*, 2007).

Para obtener las velocidades de asociación y disociación del agonista (k_1 y k_2 , respectivamente) utilizamos la fase de activación de las corrientes macroscópicas obtenidas a distintas concentraciones de 5-HT y las ajustamos al modelo cinético en el cual el receptor debe unir 3 moléculas de agonista previo a la apertura del canal. Para este procedimiento supusimos todos los sitios del receptor de igual afinidad por el agonista, por lo que las velocidades finales de asociación y disociación son el producto de su constante cinética (k_1 y k_2) y un factor estadístico que refleja el número de sitios disponibles para la unión del agonista. Por medio de la función MAC, del programa QuB (ver Metodología) obtuvimos, para distintas corrientes adquiridas a distintas concentraciones de agonista, los valores de k_1 y k_2 . Brevemente, el programa, en base a un modelo propuesto, modifica las velocidades para cada paso de transición de manera tal de

aproximar la corriente teórica a la experimental hasta lograr el mejor ajuste a lo largo de 10-20 iteraciones en base al criterio de máxima similitud (Figura II.24 y II.25). Los valores de k_1 y k_2 obtenidos a partir de las corrientes fueron de $1,5 \pm 0,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $150 \pm 90 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

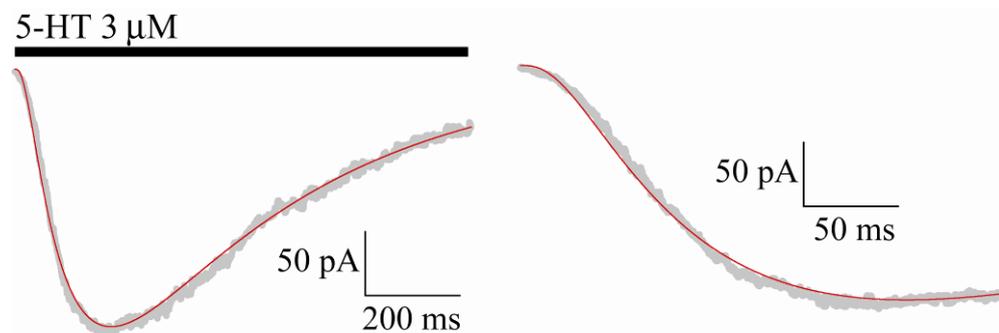


Figura II.24: Ajuste (rojo) de las corrientes experimentales (gris) mediante el programa QuB en función del modelo propuesto en el esquema II.8. Se observa la corriente y la fase de activación a dos escalas temporales.

Para corroborar la presencia de los pasos de bloqueo dentro del esquema propuesto, realizamos el mismo análisis de ajuste sobre corrientes obtenidas a altas concentraciones de agonista (10 y 100 μM de 5-HT). Para ello utilizamos un esquema conteniendo los correspondientes estados bloqueados (Esquema II.9), el cual integra los esquemas II.8 y II.3. Las velocidades k_{+bR} y k_{-bR} (bloqueo rápido y desbloqueo rápido, respectivamente) fueron fijadas en base a los valores obtenidos de los registros de canal único ($1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y 60.000 s^{-1} , respectivamente). Las demás velocidades se dejaron libres para permitir que el programa converja a valores que mejor ajusten la curva teórica a la experimental. La curva teórica obtenida ajustó correctamente la curva experimental permitiendo así corroborar el esquema cinético propuesto (Figura II.25). El valor obtenido de k_{+bL} (velocidad de bloqueo lento) fue de $\sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

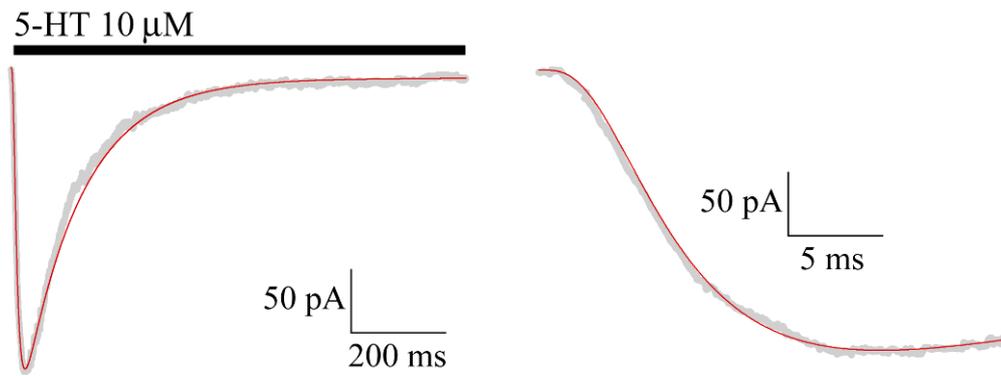
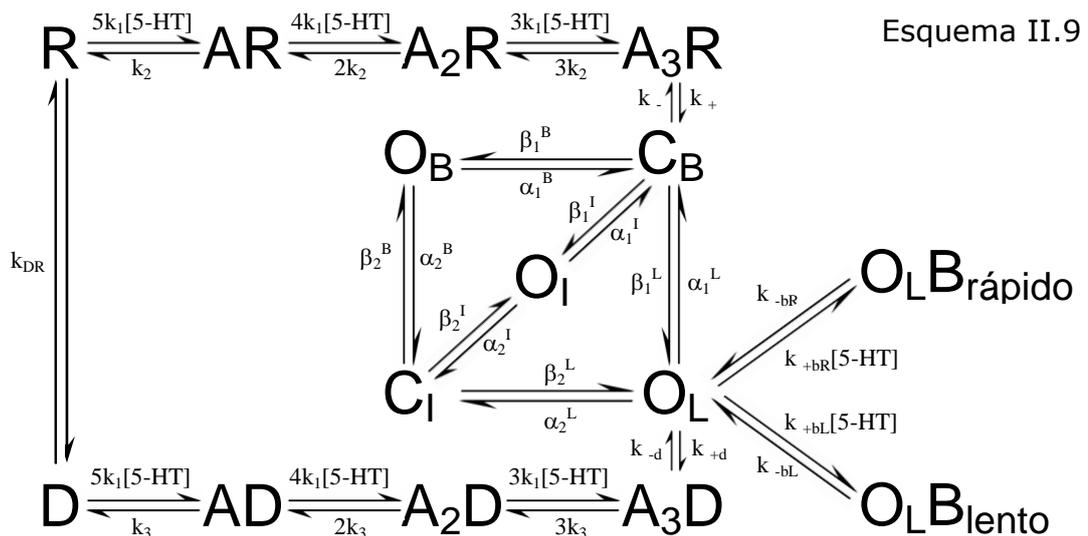


Figura II.25: Ajuste (rojo) de las corrientes experimentales (gris) mediante el programa QuB en función del modelo propuesto en base al esquema II.9. Se observa la corriente y la fase de activación a dos escalas temporales.

Por lo tanto, el modelo completo que representa de manera apropiada, tanto los resultados obtenidos a partir de corrientes macroscópicas como de registros de canal único, puede esquematizarse de la siguiente manera:



Y sus velocidades se encuentran resumidas en la tabla II.6:

Esquema II.9		
k_1	$1,5 \times 10^7$	$M^{-1}s^{-1}$
k_2	150	s^{-1}
k_3	0.27	s^{-1}
k_+	550	s^{-1}
k_-	2.200	s^{-1}
k_{+d}	1,2	s^{-1}
k_{-d}	0,01	s^{-1}
k_{+bR}	$1,3 \times 10^6$	$M^{-1}s^{-1}$
k_{-bR}	60.000	s^{-1}
k_{+bL}	2×10^5	$M^{-1}s^{-1}$
k_{-bL}	5	s^{-1}
k_{DR}	1,5	s^{-1}
β_1^B	4.200	s^{-1}
α_1^B	1.500	s^{-1}
β_1^I	8.600	s^{-1}
α_1^I	280	s^{-1}
β_1^L	25.500	s^{-1}
α_1^L	15	s^{-1}
β_2^B	4.500	s^{-1}
α_2^B	3.300	s^{-1}
β_2^I	250	s^{-1}
α_2^I	20	s^{-1}
β_2^L	0,4	s^{-1}
α_2^L	0,3	s^{-1}

Tabla II.6: Velocidades para las distintas transiciones del esquema II.9 que representa la activación, desensibilización, bloqueo y recuperación del receptor 5-HT_{3A}-AC.

Los valores k_{-bL} y k_{DR} se fijaron arbitrariamente para obtener la mejor representación de los datos experimentales por parte de los datos simulados a partir del esquema II.9. k_{DR} corresponde al paso de recuperación del receptor desde el estado desensibilizado D hacia el de reposo R. La velocidad de desensibilización desde el estado de reposo R se consideró prácticamente nula.

Corrientes y canales simulados en base al esquema propuesto.

Para corroborar que el esquema II.9 representa correctamente, tanto el comportamiento a nivel de corrientes macroscópicas como de canal único para el receptor homopentamérico 5-HT_{3A}, obtuvimos registros simulados a distintas concentraciones de agonista a partir de dicho esquema por medio del programa QuB (ver Metodología).

Las corrientes macroscópicas fueron simuladas a distintas concentraciones de 5-HT considerando 150 canales. Estas fueron similares a las obtenidas experimentalmente, mostrando una lenta activación y una caída que ajustó con uno o dos componentes según la concentración simulada. Los resultados se observan en la Figura II.26, donde la curva dosis-respuesta obtenida a partir de las corrientes simuladas aproxima correctamente a los datos experimentales, con un $EC_{50} = 2,3 \pm 0,1$ y un coeficiente de Hill de $2,1 \pm 0,2$ (media \pm error estándar, $r^2 = 0,99$).

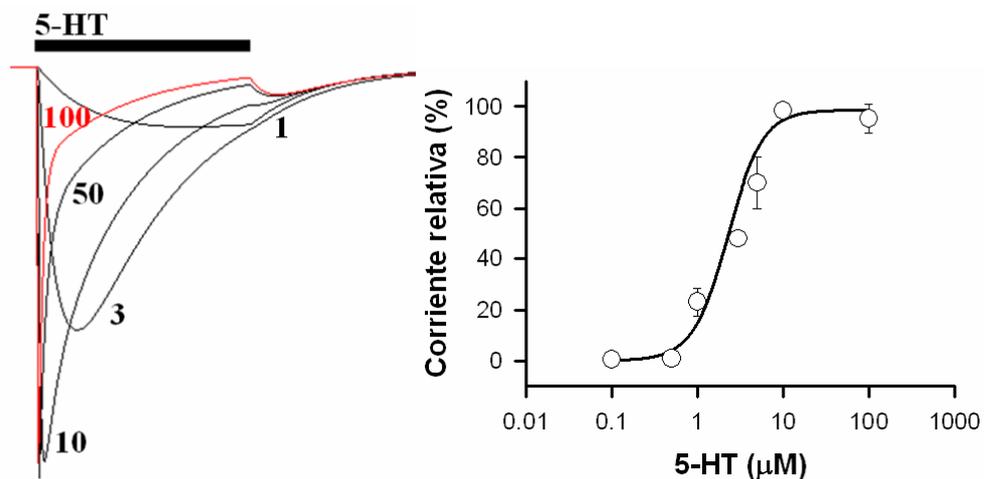


Figura II.26: Simulación en base al esquema II.9.

Izquierda: Corrientes macroscópicas obtenidas en base al esquema II.9 a las distintas concentraciones de agonista indicadas (μM). *Derecha:* Curva dosis-respuesta obtenida a partir de las corrientes simuladas (línea negra). La curva aproxima correctamente los datos experimentales (\circ).

Cuando el pulso de agonista es lo suficientemente breve, la caída de las corrientes ocurre por la recuperación del receptor hacia el estado de reposo (R) en ausencia de agonista. Según se propuso para el receptor salvaje, una vez que el receptor se activa, regresa al estado R por la vía de desensibilización (Solt *et al.*, 2007). Para verificar nuestro modelo, obtuvimos corrientes macroscópicas experimentales y simuladas en base al esquema II.9 activadas por pulsos breves (100 ms) y prolongados (1,5 s) de agonista. Para las corrientes, tanto experimentales como simuladas, activadas por pulsos breves, los tiempos de caída fueron similares a los

obtenidos a partir de pulsos prolongados (Figura II.27). Solo se observó una leve disminución en el tiempo de caída de las corrientes obtenidas por activación breve a $3 \mu\text{M}$ de 5-HT, tanto en las corrientes experimentales como simuladas. Los valores fueron $0,3 \pm 0,1 \text{ s}$ y $1,2 \pm 0,8 \text{ s}$ obtenidas a partir de las activaciones breves y prolongadas, respectivamente. Para $10 \mu\text{M}$ de 5-HT, las corrientes obtenidas a partir de un pulso breve de agonista ajustaron con dos componentes, $\tau_{\text{lento}} = 460 \pm 150 \text{ ms}$ y $\tau_{\text{rápido}} = 130 \pm 80 \text{ ms}$, los cuales fueron idénticos a los obtenidos experimentalmente a partir de las corrientes activadas por un pulso prolongado a esta concentración (Figura II.27, Tabla II.1).

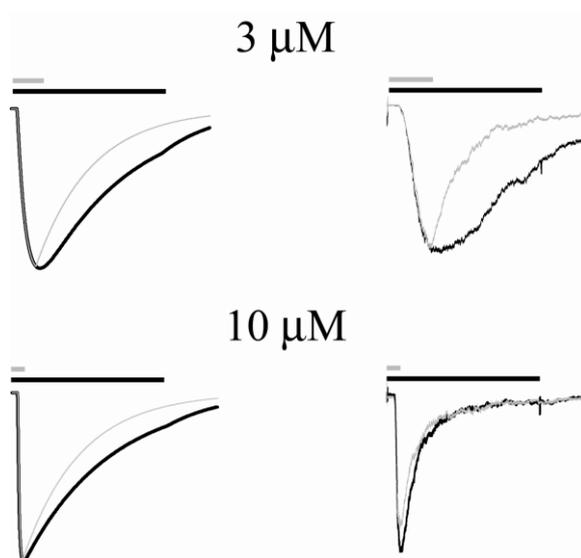


Figura II.27: Simulación en base al esquema II.9.

Izquierda: Corrientes macroscópicas simuladas en base al esquema II.9.

Derecha: Corrientes experimentales obtenidas a partir del receptor $5\text{-HT}_{3A}\text{-AC}$.

En todos los casos los receptores fueron activados por un pulso breve para obtener la caída por desactivación (300 ms para $3 \mu\text{M}$ y 100 ms para $10 \mu\text{M}$ de 5-HT: gris) y un pulso prolongado para la desensibilización (1,5 s a ambas concentraciones: negra).

Los canales simulados a partir del esquema II.9 mostraron un comportamiento muy similar al observado en los registros experimentales (Figura II.28), con aperturas sucesivas separadas por cierres breves formando *bursts* aislados o agrupados en *clusters*. A partir de los histogramas obtenidos del análisis de los eventos simulados verificamos

que los tiempos de estado abierto y cerrado fueron similares a los obtenidos experimentalmente (Figura II.28).

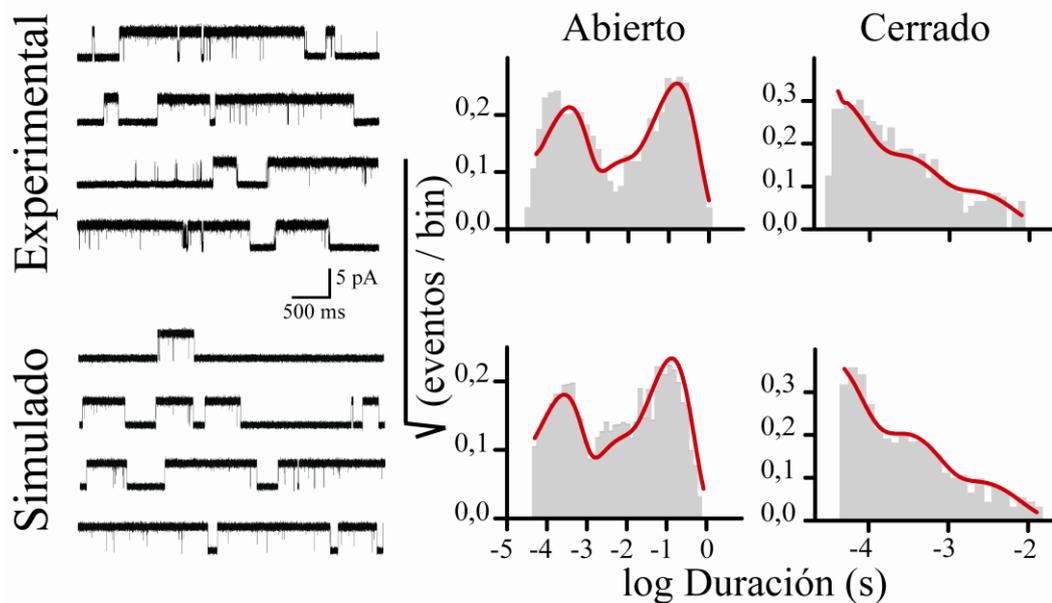


Figura II.28: Registros de canal único obtenidos por simulación a partir del esquema II.9.

Izquierda: Registros de canal único experimentales y simulados. *Derecha:* Histogramas de tiempos de estado abierto y cerrado correspondiente a los registros luego de la selección de los *clusters*. Potencial de membrana -70 mV, filtro 10 kHz.

Ajustando las corrientes macroscópicas a esquemas de activación donde el receptor puede abrirse al unir 1, 2, 3, 4 ó 5 moléculas de agonista, observamos que el mejor ajuste se logra cuando se establece la apertura del receptor a partir de la unión de 3 moléculas de agonista (se observa un mejor ajuste de la curva teórica sobre la experimental en base a la suma del error al cuadrado, **SSE**: *Sum of Square Errors*) (Figura II.29). Como se observa en la figura II.29, los ajustes obtenidos a partir de esquemas que requieren la unión de 1 y 2 moléculas de 5-HT lograron representar correctamente la fase de activación observada en las corrientes experimentales pero con un mayor error en el ajuste (mayor SSE), aunque este no fue significativamente diferente del obtenido del esquema conteniendo 3 moléculas de agonista. Por otro lado, los modelos en los que restringimos la apertura del canal a partir de la unión de 4 ó 5 moléculas de 5-HT no ajustaron correctamente la fase de activación de las corrientes experimentales. Esto se comprueba al observar los valores del error de

dicho ajuste (SSE), el cual fue significativamente mayor que el obtenido al realizar el ajuste con 3 moléculas de agonista (Figura II.29).

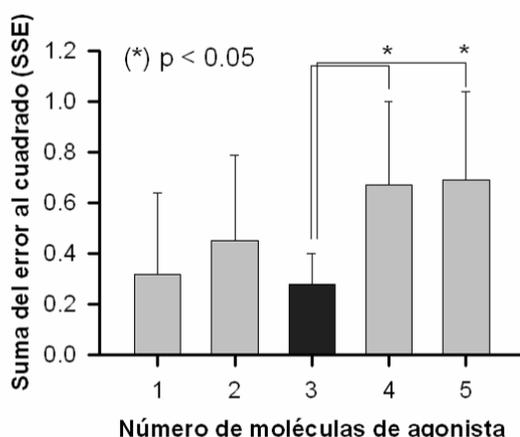


Figura II.29: Comparación del ajuste logrado de la fase de activación de las corrientes experimentales en base al esquema II.9. Se modificó dicho esquema variando el número de moléculas de agonista necesario para generar la apertura del canal. Los valores de SSE obtenidos para los distintos modelos propuestos indican la diferencia entre el ajuste y la curva experimental.

Utilizando el esquema II.9 realizamos un protocolo de doble pulso para evaluar la cinética de recuperación desde el estado desensibilizado de corrientes simuladas (Figura II.30). Los resultados fueron concordantes con los observados experimentalmente, presentando valores de $\tau_{\text{rec}} = 3,7 \pm 0,5 \text{ s}$ y $n = 2,8 \pm 0,6$. Al realizar el mismo protocolo, pero utilizando esquemas con uno o dos pasos de unión de agonista, las curvas teóricas se alejaron de los valores experimentales (Figura II.30).

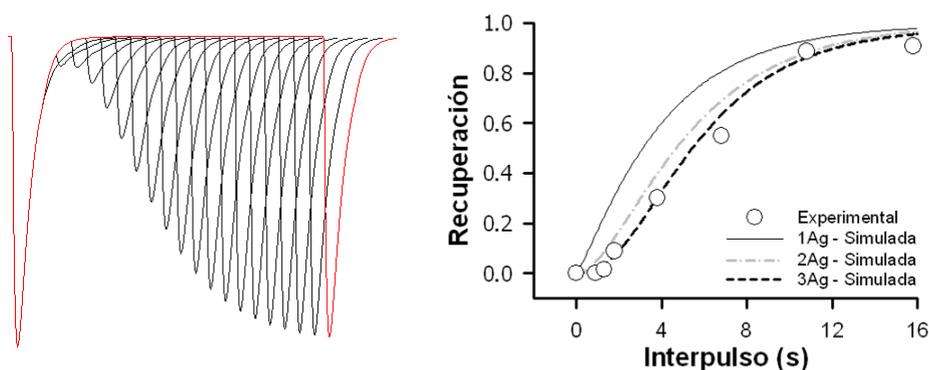


Figura II.30: Recuperación de la corriente macroscópica simulada en base al esquema II.9. *Izquierda:* Pulsos cada 1 s, desde 0 a 20 s, simulados a 3 μM de 5-HT. *Derecha:* Los valores obtenidos de la simulación en base al esquema II.9 (línea de trazos negra) aproximaron correctamente los datos experimentales (○). Los esquemas con 1 ó 2 pasos de unión de agonista (Ag) no representaron correctamente dichos datos experimentales.

Todo esto confirma, una vez más, que el esquema II.9 es un modelo cinético que puede explicar con un alto grado de exactitud el comportamiento del receptor 5-HT_{3A}-AC.

II.2) APORTE DE LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES AL FUNCIONAMIENTO DEL RECEPTOR. Rol del segmento transmembranal M4.

Al igual que para los demás receptores que conforman la familia de canales iónicos activados por ligando, en el receptor 5-HT_{3A} el segmento transmembranal M2 conforma las paredes del poro y contiene los residuos que actúan de compuerta para restringir el paso de iones (Reeves *et al.*, 2001; Lummis S.C., 2004) (ver Introducción). Aunque diversos estudios demostraron la ubicación de los segmentos transmembranales M1, M3 y M4 lejos del poro iónico, distintas evidencias a lo largo de varios años confirmaron la participación de todos los segmentos transmembranales en el correcto funcionamiento del receptor (Lobitz *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003) demostrando que la cinética en el control del paso de iones a través del poro no es exclusividad del segmento M2.

De los cuatro segmentos transmembranales que pertenecen a cada subunidad, M4 es el más alejado del poro, y las hélices M1 y M3 se interponen separándolo del segmento M2 (Figura II.31). M4 es el segmento más hidrofóbico y se encuentra en estrecho contacto con el ambiente lipídico de la membrana plasmática, y en comparación con otros segmentos, es el menos conservado evolutivamente. Su contribución al correcto gatillado del canal para el AChR fue demostrada previamente, donde distintos residuos se identificaron como importantes en el proceso de apertura, cierre y desensibilización del receptor (Blanton y Cohen, 1992; Bouzat *et al.*, 1994; Blanton y Cohen, 1994; Lasalde *et al.*, 1996; Bouzat *et al.*, 1998; Bouzat *et al.*, 2000; Bouzat *et al.*, 2002; Mitra *et al.*, 2004).

Nuestro objetivo en esta parte del trabajo es determinar si residuos del segmento M4 del receptor 5-HT_{3A} contribuyen al correcto gatillado del canal. Las mutaciones probadas fueron realizadas sobre residuos homólogos al AChR que ya fueron demostrados como importantes para su

normal funcionamiento (Figura II.31). Por lo tanto, realizamos las siguientes mutaciones sobre el segmento M4: S14'T, S14'L, S14'A, V10'C y V10'A.

		M4																	
												10'			14'				
rata	5-HT _{3A}	L	L	F	R	I	Y	L	L	A	V	L	A	Y	S	I	T	L	V
ratón	5-HT _{3A}	L	L	F	R	I	Y	L	L	A	V	L	A	Y	S	I	T	L	V
humano	5-HT _{3A}	L	L	F	H	I	Y	L	L	A	V	L	A	Y	S	I	T	L	V
humano	5-HT _{3B}	L	L	F	Q	S	Y	L	F	M	L	G	I	Y	T	I	T	L	C
rata	nAChR α 1	I	L	L	G	V	F	M	L	V	C	L	I	G	T	L	A	V	F
ratón	nAChR α 1	I	L	L	G	V	F	M	L	V	C	L	I	G	T	L	A	V	F
humano	nAChR α 1	I	L	L	G	V	F	M	L	V	C	I	I	G	T	L	A	V	F
ratón	nAChR α 7	L	C	L	M	A	F	S	V	F	T	I	I	C	T	I	G	I	L
humano	nAChR α 7	L	C	L	M	A	F	S	V	F	T	I	I	C	T	I	G	I	L

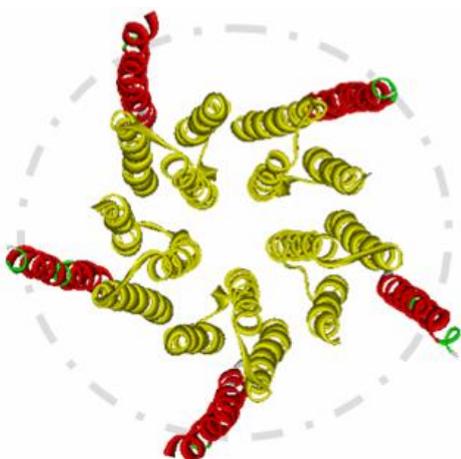


Figura II.31: Arriba: Alineamiento de las secuencias de los segmentos M4 para subunidades A y B del 5-HT_{3R}, y α del AChR. Izquierda abajo: Ubicación de los segmentos M4 (rojo). Orientación de los segmentos transmembranales vistos desde el espacio extracelular para el AChR de torpeda (PDB: 1OED).

Corrientes macroscópicas.

Tanto el receptor 5-HT_{3A}-AC (control) como los receptores conteniendo las mutaciones en los residuos de M4 se activaron con distintas concentraciones de 5-HT mostrando, luego de la activación, una lenta caída de la corriente en presencia constante de agonista debida a desensibilización (Figura II.31). Ninguna de las mutaciones generó un cambio significativo respecto del receptor control a nivel de las corrientes macroscópicas. Sin embargo, para S14'T, se observó un desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia valores mayores de concentración (Figura II.32).

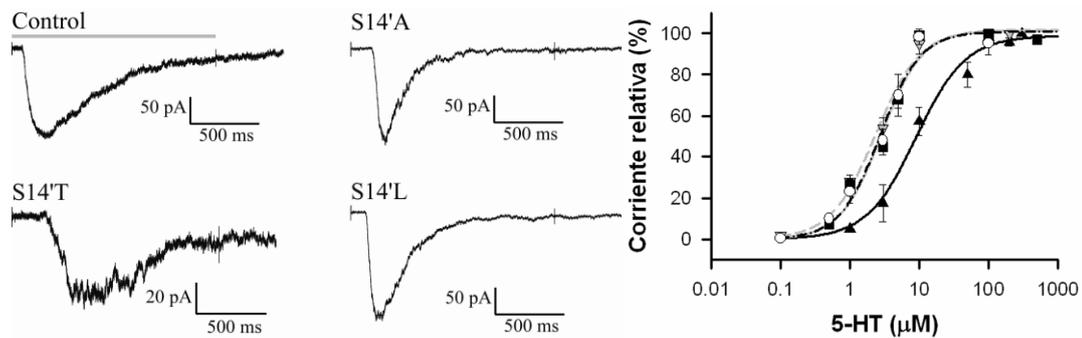


Figura II.32: Efecto de las mutaciones en S14' de M4.

Izquierda: Corrientes macroscópicas adquiridas a $3 \mu\text{M}$ de 5-HT para los receptores $5\text{-HT}_{3\text{A}}\text{-AC}$ (control) y mutados en 14' de M4.

Derecha: Curvas dosis-respuesta para el receptor control y mutados en S14' de M4. Control (\circ): $\text{EC}_{50} = 2,7 \mu\text{M}$; S14'A (∇): $\text{EC}_{50} = 2,8 \mu\text{M}$; S14'T (\blacktriangle): $\text{EC}_{50} = 8,9 \mu\text{M}$ y S14'L (\blacksquare): $\text{EC}_{50} = 2,3 \mu\text{M}$.

Las mutaciones en 10' de M4 no mostraron cambios significativos en las corrientes macroscópicas obtenidas a 3 y $10 \mu\text{M}$ de 5-HT. Dichas corrientes ajustaron con uno y dos componentes, respectivamente, al igual que en el receptor control, cuyas caídas mostraron valores similares (Figura II.33). A partir de las curvas dosis-respuesta obtuvimos los valores de EC_{50} , los cuales fueron de 2,3 y $2,5 \mu\text{M}$ para V10'A y V10'C, respectivamente, similares al valor obtenido para el receptor control.

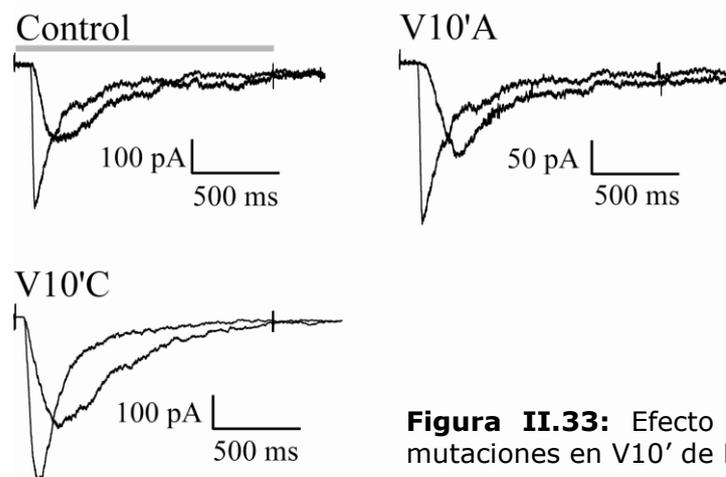


Figura II.33: Efecto de las mutaciones en V10' de M4.

Registros de canal único.

Para todos los casos, el comportamiento de los receptores mutados en M4 fue similar al del receptor control, mostrando largos trazos de activación compuestos por aperturas sucesivas separadas por cierres breves conformando *bursts* aislados o agrupados en *clusters*. Los receptores se activaron en un rango de concentración entre 0,5-10 μM de 5-HT, y una vez más, no se observó una cinética dependiente de la concentración de agonista.

De los registros obtenidos a partir de las mutaciones en 14' construimos los correspondientes histogramas de tiempos de cierre y apertura, no observando diferencias significativas de sus valores respecto de los valores para el receptor control (Tabla II.7, Figura II.34).

En cambio, para las mutaciones en 10' observamos una reducción ~ 3 veces en la duración del componente de estado abierto O_L respecto del receptor control ($p < 0,05$) (Tabla II.7, Figura II.34).

5-HT _{3A} R	O _L (ms)	O _I (ms)	O _B (ms)	C _L (ms)	C _I (ms)	C _B (ms)
Control	118 ± 6	1,6 ± 0,9	0,17 ± 0,02	2,3 ± 0,6	0,20 ± 0,03	0,03 ± 0,01
S14'A	98 ± 26	3,0 ± 1,4	0,20 ± 0,01	0,6 ± 0,3	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,01
S14'T	150 ± 25	2,4 ± 1,2	0,23 ± 0,13	0,6 ± 0,2	0,10 ± 0,02	0,02 ± 0,01
S14'L	107 ± 37	2,3 ± 1,2	0,20 ± 0,04	1,4 ± 0,6	0,20 ± 0,06	0,03 ± 0,01
V10'A	64 ± 16*	1,3 ± 0,8	0,19 ± 0,03	2,9 ± 0,8	0,20 ± 0,07	0,04 ± 0,01
V10'C	41 ± 13*	2,1 ± 1,7	0,16 ± 0,03	1,0 ± 0,1	0,30 ± 0,20	0,04 ± 0,02

Tabla II.7: Activación de los receptores 5-HT_{3A}-AC control y mutados en M4.

Todos los valores fueron obtenidos a partir de registros activados por 1 μM de 5-HT. Los datos corresponden a los tiempos de estado abierto y cerrado que conforman un *cluster*. Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar de al menos tres registros para cada caso.

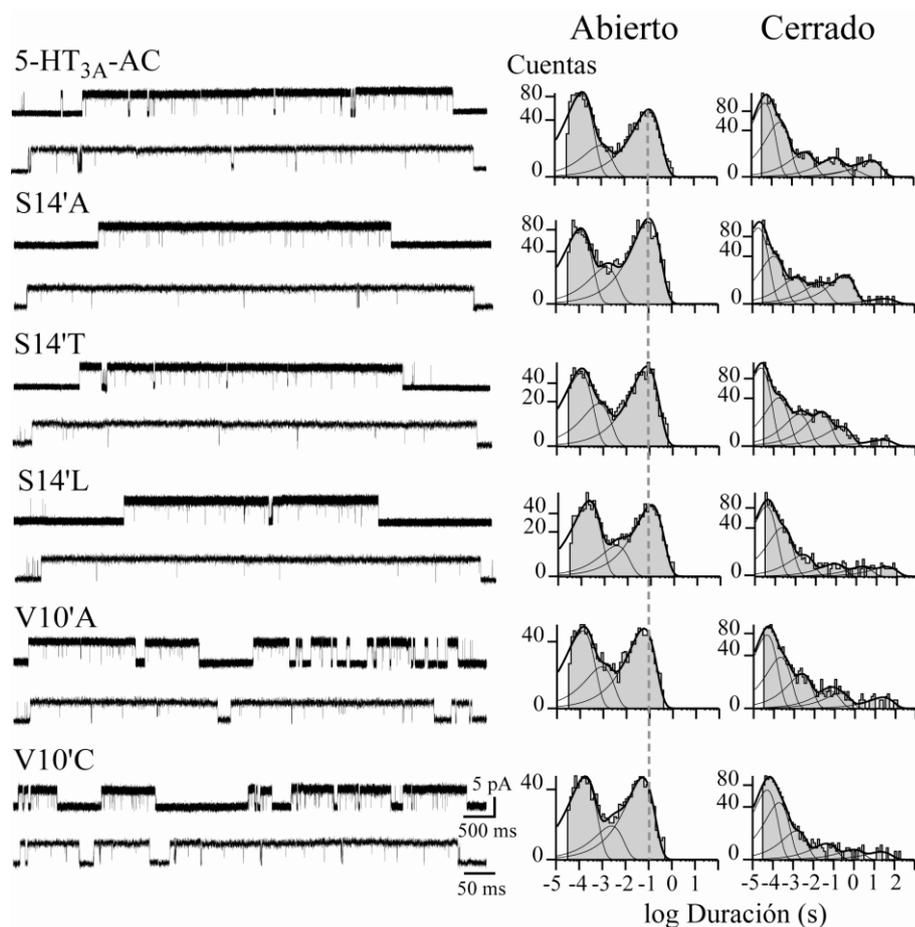


Figura II.34: Registros de canal único obtenidos a partir de los receptores 5-HT_{3A}-AC control y mutados en M4. *Izquierda:* Registros de canal único mostrados a dos escala temporales. Potencial de membrana: -70 mV, filtro 10 kHz. *Derecha:* Histogramas de apertura y cierre obtenidos para cada receptor.

Análisis cinético.

Entre las mutaciones evaluadas sobre el segmento M4, las realizadas sobre la posición 10' generaron los cambios más significativos (Tabla II.7, Figura II.34). A partir de los registros de canal único, observamos para este receptor mutante una reducción en la duración del tiempo de estado abierto O_L , tanto para la mutante V10'A como V10'C. Para cuantificar los cambios cinéticos generados por dichas mutaciones, realizamos el análisis de los *clusters* obtenidos a un rango de concentraciones de 5-HT entre 0,5-3 μ M utilizando el modelo cinético básico propuesto para el receptor control (Esquema II.6). Obtuvimos así los valores de las velocidades para cada transición, donde observamos que los cambios más significativos provocados por dichas mutaciones afectaron la velocidad de apertura y

cierre del receptor desde el estado cerrado C_I hacia el abierto O_L (velocidades β_1^L y α_1^L , respectivamente) (Esquema II.6, Tabla II.8). Por otro lado, también observamos una disminución en la velocidad k_+ para ambas mutaciones, aunque no evidenciamos un cambio significativo en la velocidad de activación de las corrientes macroscópicas.

Esquema II.6				
	Control	V10'A	V10'C	
k_+	530 ± 35	165 ± 20	150 ± 10	s^{-1}
k_-	2.200 ± 165	810 ± 100	1.150 ± 100	s^{-1}
β_1^B	4.150 ± 500	4.025 ± 390	4.040 ± 320	s^{-1}
α_1^B	1.530 ± 110	3.070 ± 250	2.750 ± 180	s^{-1}
β_1^I	8.600 ± 950	3.710 ± 490	1.430 ± 225	s^{-1}
α_1^I	275 ± 60	280 *	280 *	s^{-1}
β_1^L	25.540 ± 1.270	16.300 ± 770	6.900 ± 390	s^{-1}
α_1^L	$15 \pm 0,7$	$20 \pm 0,8$	35 ± 1	s^{-1}
β_2^B	4.500 ± 200	2.500 ± 150	3.320 ± 180	s^{-1}
α_2^B	3.310 ± 190	3.960 ± 310	3.740 ± 200	s^{-1}
β_2^I	240 ± 100	150 ± 70	170 ± 70	s^{-1}
α_2^I	20 ± 10	20 *	20 *	s^{-1}
β_2^L	$0,4 \pm 0,3$	0,5 *	0,5 *	s^{-1}
α_2^L	$0,3 \pm 0,1$	0,5 *	0,5 *	s^{-1}

Tabla II.8: Análisis cinético de los receptores control y mutados en 10' de M4. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos mediante el ajuste de los histogramas experimentales en base al esquema II.6 por medio del programa MIL (ver Metodología). Las velocidades corresponden al ajuste de al menos tres registros para cada condición, y se expresan como la media \pm error estándar. (*) Velocidades que fueron fijadas para lograr un mejor ajuste.

Todos estos resultados demuestran que el segmento M4 del receptor 5-HT_{3A}-AC contribuye a su cinética de activación. Resultados similares fueron demostrados para el AChR, indicando la importancia de dicho segmento debido a la conservación de su función a lo largo de la evolución (Ortiz-Miranda *et al.*, 1997; Bouzat *et al.*, 1998).

Discusión.

El receptor tipo 3 es el único miembro de la familia de receptores activados por serotonina que pertenece a la gran familia de canales iónicos activados por ligandos (LGIC). Hasta el momento se han identificado cinco subunidades homólogas (A-E) y algunas variantes de *splicing* (A_L , A_S , E_a). La subunidad A es la única capaz de asociarse para formar receptores homopentaméricos, y aparentemente, es la forma más abundante presente en sistemas biológicos (Maricq *et al.*, 1991; van Hooft *et al.*, 1997; van Hooft y Vijverberg, 2000; Niesler *et al.*, 2007).

La implicancia de este receptor en diversas funciones fisiológicas, en sistema periférico, tanto entérico como cardiovascular (Hanna *et al.*, 2000), y en el sistema nervioso central (Laporte *et al.*, 1992), lo han convertido en blanco para el estudio de la acción de diversos moduladores. El objetivo de su estudio es intentar controlar distintas afecciones en las que el receptor se ve involucrado, como desórdenes del comportamiento (esquizofrenia, bulimia, anorexia), enfermedades neurodegenerativas, control del vómito en pacientes bajo tratamiento quimioterápico, disminución de náuseas durante el embarazo, y tratamiento de pacientes con síndrome de colon irritable.

El receptor homopentamérico 5-HT_{3A} presenta una muy baja conductancia, lo que hasta el momento ha limitado su estudio a nivel de corrientes macroscópicas. Sin embargo, trabajos realizados sobre receptores heteropentaméricos 5-HT_{3AB} y quimeras realizadas entre ambas subunidades A y B, permitió identificar la importancia de tres residuos arginina (R) presentes en el *loop* M3-M4 de la subunidad A, en la determinación de la baja conductancia del receptor homopentamérico, la cual es notablemente mayor en el receptor heteropentamérico ($\sim 0,1$ pS para el receptor 5-HT_{3A} y ~ 20 pS para receptor 5-HT_{3AB}). Al mutar dichos residuos arginina de la subunidad A por aquellos presentes en la posición equivalente dentro de la subunidad B, se obtiene un receptor homopentamérico tipo A de alta conductancia, $5\text{-HT}_{3A}\text{-AC}$ (Kelley *et al.*, 2003).

La completa caracterización de dicho receptor, en base a estudios electrofisiológicos, permitirá una mejor interpretación de los efectos provocados por mutaciones o moduladores, para así poder tratar las afecciones relacionadas a su funcionamiento.

Utilizando el receptor homopentamérico 5-HT_{3A} de alta conductancia (5-HT_{3A}-AC), obtuvimos corrientes macroscópicas, las cuales decaen lentamente (del orden del segundo), y cuya amplitud aumenta en función de la concentración de agonista. A partir de las corrientes obtenidas construimos la curva dosis-respuesta, la cual presentó un valor de EC₅₀ de ~2,8 μM y un coeficiente de Hill de ~2. Dichos valores fueron similares a los reportados por varios autores para el receptor salvaje (Maricq *et al.*, 1991; Hussy *et al.*, 1994; Mott *et al.*, 2001; Solt *et al.*, 2007). Estos datos confirmaron que las mutaciones generadas para lograr el receptor de alta conductancia no afectan la cinética de activación del receptor respecto del receptor salvaje. Además, un estudio reciente demostró que la completa eliminación del *loop* M3-M4 del receptor 5-HT_{3A} afecta principalmente la conductancia del canal sin afectar significativamente la cinética del receptor (Jansen *et al.*, 2008).

En registros de canal único, el receptor 5-HT_{3A}-AC se activa mostrando eventos de ~4,7 pA agrupados en largos trazos de activación (*clusters*) conformados por tres tipos de aperturas y tres tipos de cierres. Cada *cluster* está conformado por 2-3 *bursts*. Cada *burst* está conformado por los tres tipos de aperturas definidos para los *clusters* y los dos cierres más breves. El tiempo de cierre más prolongado que pertenece al *cluster*, es el que separa los *bursts* que conforman dicho *cluster* (tiempo inter-*burst*). Los tiempos de duración de los componentes de cierre y apertura que conforman los *clusters*, y el valor de P_{apertura} de los mismos no mostraron dependencia con la concentración de 5-HT. Dicho resultado fue similar a lo reportado para el receptor quimérico α7-5HT_{3A} (Rayes *et al.*, 2005) y el receptor nicotínico α7 (Bouzat *et al.*, 2008). Esto indicaría que, una vez que el receptor ha unido el número óptimo de moléculas de agonista, se abre para conformar un *burst* y con ellos un *cluster*, el cual finaliza por desensibilización (Bouzat *et al.*, 2008). Este tipo de activación,

independiente de la concentración de agonista, no es común entre los miembros de esta familia de receptores (tales como los receptores de glicina y de acetilcolina AChR), donde en general se observan cambios en los tiempos de cierre y en el valor de la P_{apertura} en función de la concentración del agonista utilizado (Sine *et al.*, 1990; Bouzat *et al.*, 2002; Beato *et al.*, 2004; Burzomato *et al.*, 2004).

Los datos obtenidos a partir de los registros de canal único del receptor 5-HT_{3A}-AC mostraron una reducción del tiempo de estado abierto de larga duración (O_L) con el incremento en la concentración de 5-HT (a valores superiores a 5 μM), lo que se debió al bloqueo del canal provocado por el agonista. Al graficar la inversa del tiempo de estado abierto O_L en función de la concentración de 5-HT (Figura II.11), los datos experimentales ajustaron con una recta definida por la ecuación II.2. A partir de estos datos obtuvimos el valor de la constante de bloqueo, k_{+bR} , la cual fue de $1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dicho valor fue confirmado utilizando la quimera $\alpha 7\text{-}5\text{HT}_{3A}$, a partir de la cual obtuvimos, además, el valor de la constante de desbloqueo k_{-bR} ($\sim 60.000 \text{ s}^{-1}$).

Con el fin de determinar un esquema cinético que pudiera explicar correctamente los resultados observados, tanto a nivel de corrientes macroscópicas como de canal único, basamos inicialmente nuestro estudio sobre los *clusters* obtenidos a bajas concentraciones de agonista, donde el bloqueo es mínimo. Por ello obtuvimos registros de canal único en un rango de concentración de 5-HT entre 0,5 y 3 μM , y corrientes macroscópicas activadas por 3 μM de 5-HT. A esta concentración las corrientes ajustaron con un único componente, cuyo valor aproximó al tiempo de duración de los *clusters* ($\sim 1,2 \text{ s}$).

Los *clusters* presentaron tres tipos de aperturas separadas por tres tipos de cierres. De la inspección visual determinamos que las aperturas y los cierres pueden estar conectados en cualquier orden, y que los *bursts* pueden comenzar y finalizar con cualquiera de las tres aperturas (Figura II.18). Por ello, concluimos que un esquema cíclico que conecte los distintos estados abierto con los cerrados, sería el que mejor represente los datos experimentales observados (Esquema II.4).

Para poder explicar los datos experimentales, los cuales muestran corrientes macroscópicas de lenta activación (un máximo de $\sim 300 \text{ s}^{-1}$, Figura II.23) pero *bursts* compuestos por cierres muy breves (del orden de los microsegundos), lo que indicaría una rápida velocidad de apertura ($20.000\text{-}40.000 \text{ s}^{-1}$), sugerimos entonces la presencia de un paso previo a la apertura del canal (Esquema II.5). Es decir, una vez que el receptor unió el número de moléculas de agonista requeridas para su apertura, debe pasar por un estado cerrado previo (*flipped*) (C_1 en el esquema II.5 y subsiguientes), a partir del cual puede abrirse. El paso desde el estado de óptima ocupación (A_3R) al estado cerrado activable (C_1), sería el paso limitante que define la máxima velocidad de activación de las corrientes macroscópicas, cuya velocidad la definimos como k_+ . La existencia de este estado ha sido propuesto para receptores de glicina (Burzomato *et al.*, 2004), y recientemente para el receptor de ACh (Lape *et al.*, 2008).

Para generar un esquema completo de la cinética del receptor, es necesario agregar los pasos de asociación y disociación del agonista. Al tratarse de un homopentámero, el receptor puede unir desde 1 hasta 5 moléculas de agonista. Para inferir el número de moléculas de 5-HT necesarias para producir la apertura del canal, analizamos las corrientes macroscópicas obtenidas a distintas concentraciones de 5-HT. Al observar la fase de activación de las mismas, vimos que presentan un perfil sigmoideo a todas las concentraciones evaluadas (Figuras II.20 y II.21), lo que sugiere que la apertura del canal se logra al unir más de una molécula de agonista. Ajustando la fase de activación de dichas corrientes a la ecuación II.3 obtuvimos un valor de n (sigmoidicidad) cercano a 3, lo que sugiere que serían necesarias 3 moléculas de agonista para producir la apertura del canal (van Hooft y Vijverberg, 1996; Legendre P., 1998). Asimismo, el estudio de la recuperación del receptor desde el estado desensibilizado en ausencia de agonista mostró una cinética sigmoidea, indicando a partir del ajuste a la ecuación II.5, una recuperación a través de 3 pasos dependientes de agonista. Estos resultados en conjunto apoyan la hipótesis de que el receptor se abre hacia el ciclo de cierres y aperturas del esquema II.4 siguiendo tres pasos de asociación, y retorna al estado de reposo luego de la desensibilización a través de la disociación de las 3 moléculas de agonista unidas (Esquema II.8).

La activación del receptor finaliza cuando este se desensibiliza (Bouzat *et al.*, 2008). Si bien varios autores proponen que la desensibilización ocurre principalmente a partir del estado abierto, tanto para el receptor 5-HT₃ (Mott *et al.*, 2001; Solt *et al.*, 2007) como para el receptor de ACh (Auerbach y Akk, 1998; Bouzat *et al.*, 2008), el receptor puede pasar a dicho estado, en principio, tanto a partir de sus estados abiertos como cerrados. Para definir el estado a partir del cual el receptor se desensibiliza, evaluamos distintos esquemas donde conectamos el estado desensibilizado (A₃D) a cada uno de los estados que componen el ciclo que conforma un *burs.*, y simulamos tanto canales como corrientes macroscópicas utilizando el programa QuB para cada uno de dichos esquemas. En todos los casos, los registros presentaron largos *clusters* y corrientes que no decaen en el tiempo, lo que no va acorde a lo observado experimentalmente. Sin embargo, cuando conectamos el estado A₃D al estado abierto O_L (Esquema II.8), tanto los canales como las corrientes simuladas emularon los resultados obtenidos experimentalmente (Figuras II.26 y II.28).

Por lo tanto, el esquema II.8 representa correctamente la cinética de activación del receptor, ya que tanto las corrientes macroscópicas como registros de canal único simulados a partir de este fueron semejantes a los obtenidos experimentalmente. Las curvas de dosis-respuesta y de recuperación a partir de la desensibilización simuladas aproximaron correctamente los valores experimentales, apoyando así el esquema propuesto (Figuras II.28 y II.29). Por otro lado, las corrientes obtenidas a partir de pulsos breves de agonista, donde la activación del receptor finaliza por desactivación, fueron muy similares a las simuladas en base a dicho esquema cinético (Figura II.27). Sin embargo, las corrientes macroscópicas mostraron, a todas las concentraciones simuladas, una caída que ajustó con una exponencial simple (Figura II.27). Para que las corrientes simulen perfectamente las obtenidas experimentalmente, agregamos al esquema II.8 los pasos de bloqueo rápido y lento (O_LB_R y O_LB_L, respectivamente), los cuales conectamos al tiempo de estado abierto O_L en vista de la mayor probabilidad de que el canal se bloquee a partir de este estado, y en base a que fue el componente afectado por el bloqueo (Esquema II.9). Las corrientes macroscópicas simuladas a partir de este esquema ajustaron con una doble exponencial, cuyos valores fueron

similares a los obtenidos experimentalmente (Figura II.26). A partir de dicho esquema, en base a registros de canal único simulados, también confirmamos la reducción del tiempo O_L en función de la concentración de 5-HT debido al bloqueo rápido del receptor.

De esta manera demostramos que el esquema II.9 es un modelo cinético apropiado para describir la activación, desactivación, desensibilización y bloqueo del receptor homopentamérico 5-HT_{3A}.

En vista de que los residuos 10' y 14' de son importantes en el correcto funcionamiento de los receptores de ACh muscular, tanto embrionario como adulto (Lee *et al.*, 1994; Bouzat *et al.*, 2000), evaluamos el aporte de dichos residuos al funcionamiento del receptor 5-HT_{3A}. Con tal fin, realizamos mutaciones a alanina y a residuos presentes en el receptor de ACh. Para el residuo 14', también realizamos la mutación a leucina, para evaluar así el efecto ante un cambio más dramático.

De las corrientes macroscópicas obtenidas, observamos que las mutaciones, tanto en 10' como 14' no generaron cambios significativos respecto del receptor control (Figura II.32 y II.33). La única mutación que produjo un cambio respecto del receptor control fue S14'T, la cual mostró una reducción en la eficiencia de activación del receptor de ~3 veces (Figura II.32).

A nivel de canal único, ninguna de las mutaciones en 14' mostró un cambio significativo respecto del receptor control. Sin embargo, las mutaciones en 10' mostraron importantes diferencias (Figura II.33), mostrando una reducción de unas 3 veces en el tiempo de estado abierto O_L . Por lo tanto, utilizando el esquema cinético propuesto en este trabajo, realizamos el análisis cinético para los receptores mutados en 10' de M4, y demostramos que la reducción en O_L es debida a un aumento en la velocidad de cierre (α_1^L) entre 2-3 veces respecto del receptor control (Tabla II.9). Junto con esta, también se vieron afectadas otras velocidades, mostrando una disminución en la velocidad de apertura (β_1^L) y en la velocidad k_+ .

De esta manera demostramos que los residuos 10' y 14' de M4 cumplen un rol importante para el correcto funcionamiento de distintos miembros de la familia de receptores *Cys-loop*.

Además, el análisis cinético realizado para las mutaciones en 10' de M4 del receptor 5-HT_{3A} permitió validar el modelo propuesto para este receptor. Dicho esquema permitirá evaluar la acción de moduladores o mutaciones del receptor para así identificar sus mecanismos de acción o los pasos cinéticos en los que intervienen.

Conclusiones Generales

Conclusiones Generales

Los receptores pertenecientes a la familia de canales iónicos activados por ligando comparten su estructura cuaternaria, terciaria, secundaria y en gran medida primaria, lo que infiere que los mismos provienen de un ancestro común. Dicho ancestro se considera altamente probable haya sido un receptor homopentamérico, es decir, conformado por cinco copias de una misma proteína, a partir de la cual surgieron, debido a mutaciones sufridas a lo largo de la evolución, las distintas subunidades ortólogas y parálogas que constituyen esta gran familia.

Dentro de esta familia, el receptor más ampliamente estudiado, es el receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) el cual está formado por cuatro proteínas parálogas (α 1, β 1, ϵ y δ en músculo adulto). En base a diversos estudios se ha definido claramente su cinética de activación y desactivación, y han aportado importantes datos acerca de su estructura tridimensional con un alto grado de resolución. Todo esto ha convertido a este receptor en el modelo clásico para el estudio de todos los integrantes de esta familia.

En el **capítulo I** del presente trabajo, identificamos la participación del residuo 15' del segmento M1 del AChR de músculo adulto en el gatillado del canal. Demostramos que dicha región se mueve en las fases iniciales del gatillado y que esto ocurre simultáneamente para todas las subunidades del receptor implicadas en la unión del agonista (α , ϵ , y δ). β 1 es la única subunidad que presentó un valor de Φ bajo, igual a 0,28 (Spitzmaul *et al.*, 2004) indicando que dicha zona se mueve en una instancia posterior a las demás subunidades durante el gatillado del canal. Los valores de Φ que hallamos para el segmento M1 de la subunidad α fueron cercanos a los reportados para los residuos que conforman la compuerta del canal y residuos vecinos (Mitra *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2005), lo que indicaría que estos se mueven simultáneamente durante el gatillado. El efecto provocado por las mutaciones en 15' de M1 mostró estar directamente relacionado con el volumen del aminoácido en dicha posición. Para la posición 225 de la subunidad α , el aumento del volumen de la cadena lateral del residuo allí

presente llevó a una disminución de la eficiencia del gatillado del canal. Además, demostramos una interacción directa entre los residuos 15' de M1 y 11' de M2.

Por lo tanto, podemos concluir que el aumento del volumen de la cadena lateral del residuo en 15' de M1 restringe la movilidad del segmento M2 debido a su interacción directa con la leucina en 11' de dicho segmento, desfavoreciendo así la apertura del canal.

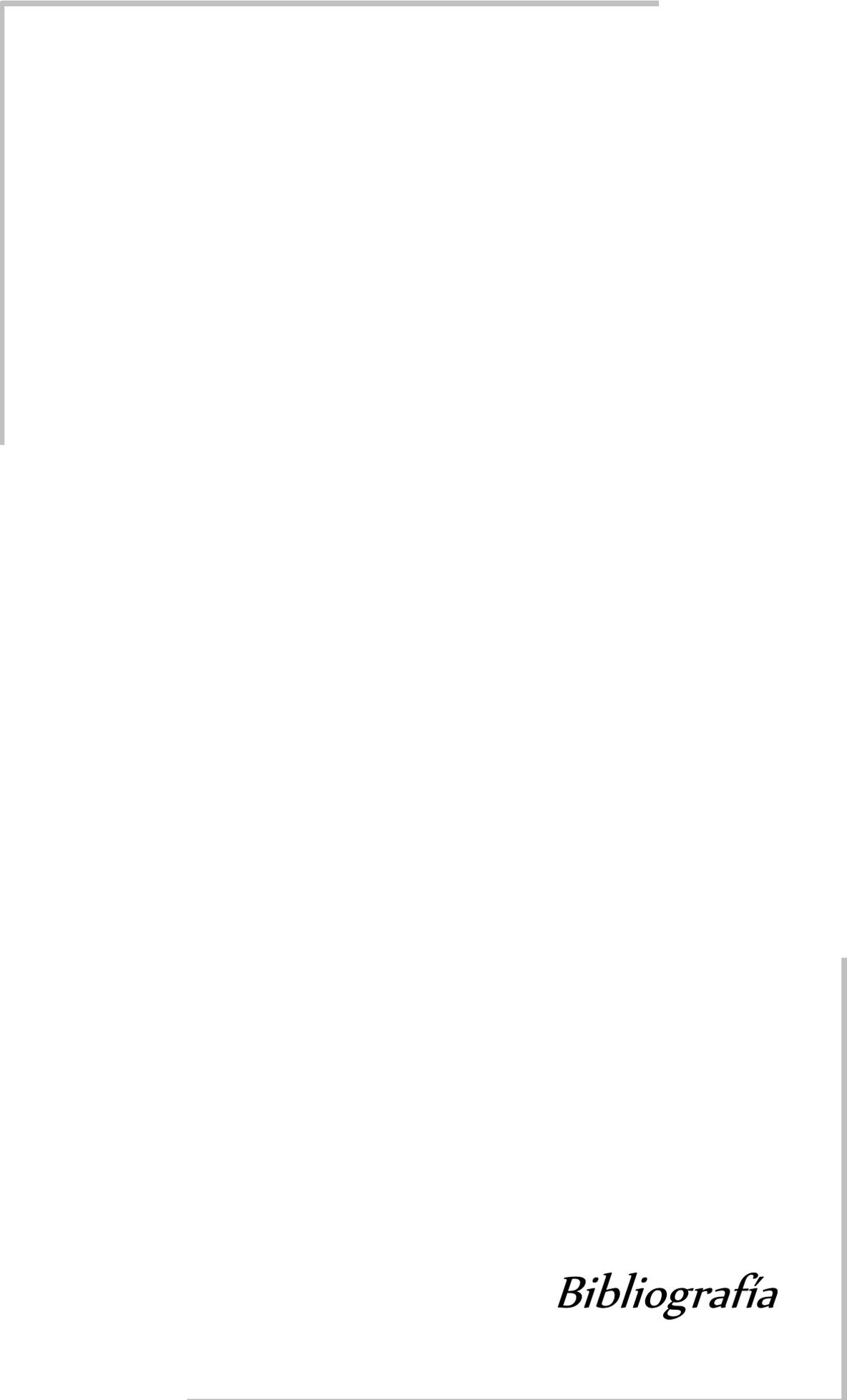
En el **capítulo II** caracterizamos por primera vez la activación del receptor homomérico 5-HT_{3A} a nivel de canal único. A partir del estudio de registros de corrientes macroscópicas y de canal único definimos un esquema cinético que describe de forma correcta los resultados observados experimentalmente reportados en este trabajo.

Demostramos la participación de residuos del segmento transmembranal M4 en el correcto funcionamiento del receptor, donde mutaciones en S14' provocaron cambios a nivel de las corrientes macroscópicas, y mutaciones en V10' generaron cambios significativos a nivel de los registros de canal único. Resultados similares fueron reportados para el receptor AChR muscular, donde mutaciones en C418 (10') o T422 (14') de la subunidad α afectaron el correcto gatillado del canal, lo que demuestra la conservación del rol del segmento M4 a lo largo de la evolución (Lee *et al.*, 1994; Ortiz-Miranda *et al.*, 1997; Bouzat *et al.*, 2000). Estos resultados permiten validar el modelo propuesto como un modelo cinético adecuado para el estudio del receptor 5-HT_{3A}.

Tomando en conjunto los resultados aquí presentados, podemos destacar la diferencia en la cinética demostrada en este trabajo y en publicaciones previas (Rayes *et al.*, 2005; Bouzat *et al.*, 2008) entre receptores homoméricos (evolutivamente más primitivos), como el receptor 5-HT_{3A} y el nicotínico $\alpha 7$ (como así también la quimera $\alpha 7$ -5HT_{3A}), y receptores heteroméricos, como el receptor AChR de músculo adulto. Los dos primeros y la quimera construida a partir de ellos, no mostraron dependencia de activación en función de la concentración de agonista a nivel de canal único, y su grado de activación, aperturas aisladas para el caso del receptor $\alpha 7$, *bursts* aislados observados a partir de la quimera, y

largos *clusters* de *bursts* obtenidos del receptor 5-HT_{3A}, solo fue restringido por el fenómeno de desensibilización. En cambio, el receptor AChR, más avanzado evolutivamente, presenta una respuesta al agonista más discreta y controlada, donde su nivel de activación está determinado no solo por su paso al estado desensibilizado, sino también por la concentración de agonista circundante, pudiendo presentar eventos discretos y aislados a concentraciones de ACh (<10 μM) o aperturas sucesivas (*clusters*) a concentraciones mayores. Dicho control en su activación en respuesta de los niveles censados de agonista sería un avance evolutivo respecto de sus antecesores homoméricos.

La determinación de un modelo que represente la cinética de estos receptores es un importante aporte para el entendimiento de los mecanismos que determinan su correcto funcionamiento. Los resultados aquí presentados otorgan herramientas cruciales para la interpretación del comportamiento de estos receptores frente a mutaciones que determinen ciertas patologías, o la acción de distintas drogas que modulen el funcionamiento de dichos receptores, tanto salvajes como mutados. Estos resultados aportan, además, datos estructurales que ayudan a comprender los mecanismos que controlan el funcionamiento de los receptores de esta familia los cuales, en conjunto con otros resultados presentes en la literatura, tienden a descifrar el intrincado mecanismo que lleva al normal funcionamiento de los receptores de esta gran familia.



Bibliografía

Bibliografía

- Adamian L, Jackups R, Jr., Binkowski TA, y Liang J. "*Higher-Order Interhelical Spatial Interactions in Membrane Proteins*". J Mol Biol. **2003**; 327: 251-272.
- Adamian L y Liang J. "*Helix-Helix Packing and Interfacial Pairwise Interactions of Residues in Membrane Proteins*". J Mol Biol. **2001**; 311: 891-907.
- Adams P.R. "*Drug Blockade of Open End-Plate Channels*". J Physiol. **1976**; 260: 531-552.
- Adams DJ y Nutter TJ. "*Calcium Permeability and Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptor-Channels in Rat Parasympathetic Neurons*". J Physiol Paris. **1992**; 86: 67-76.
- Akabas MH y Karlin A. "*Identification of Acetylcholine Receptor Channel-Lining Residues in the M1 Segment of the Alpha-Subunit*". Biochemistry. **1995**; 34: 12496-12500.
- Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P, y Karlin A. "*Identification of Acetylcholine Receptor Channel-Lining Residues in the Entire M2 Segment of the Alpha Subunit*". Neuron. **1994**; 13: 919-927.
- Auerbach A. "*How to Turn the Reaction Coordinate into Time*". J Gen Physiol. **2007**; 130: 543-546.
- Auerbach A y Akk G. "*Desensitization of Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor Channels. A Two-Gate Mechanism*". J. Gen. Physiol. **1998**; 112: 181-197.
- Auerbach A y Zhou Y. "*Gating Reaction Mechanisms for NMDA Receptor Channels*". J Neurosci. **2005**; 25: 7914-7923.
- Austin MC, Weikel JA, Arango V, y Mann JJ. "*Localization of Serotonin 5-HT_{1A} Receptor mRNA in Neurons of the Human Brainstem*". Synapse. **1994**; 18: 276-279.
- Banke TG y Traynelis SF. "*Activation of NR1/NR2B NMDA Receptors*". Nat Neurosci. **2003**; 6: 144-152.
- Barnes NM y Sharp T. "*A Review of Central 5-HT Receptors and Their Function*". Neuropharmacology. **1999**; 38: 1083-1152.
- Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, y Sivilotti LG. "*The Activation Mechanism of Alpha1 Homomeric Glycine Receptors*". J. Neurosci. **2004**; 24: 895-906.
- Beckstein O, Biggin PC, Bond P, Bright JN, Domene C, Grottesi A, Holyoake J, y Sansom MS. "*Ion Channel Gating: Insights Via Molecular Simulations*". FEBS Lett. **2003**; 555: 85-90.
- Beckstein O y Sansom MS. "*A Hydrophobic Gate in an Ion Channel: the Closed State of the Nicotinic Acetylcholine Receptor*". Phys. Biol. **2006**; 3: 147-159.
- Bertrand D y Gopalakrishnan M. "*Allosteric Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors*". Biochem Pharmacol. **2007**; 74: 1155-1163.

- Blanton MP y Cohen JB. "Mapping the Lipid-Exposed Regions in the Torpedo Californica Nicotinic Acetylcholine Receptor". *Biochemistry*. **1992**; 31: 3738-3750.
- Blanton MP y Cohen JB. "Identifying the Lipid-Protein Interface of the Torpedo Nicotinic Acetylcholine Receptor: Secondary Structure Implications". *Biochemistry*. **1994**; 33: 2859-2872.
- Bocquet N, Prado de CL, Cartaud J, Neyton J, Le PC, Taly A, Grutter T, Changeux JP, y Corringer PJ. "A Prokaryotic Proton-Gated Ion Channel From the Nicotinic Acetylcholine Receptor Family". *Nature*. **2007**; 445: 116-119.
- Boess FG, Beroukhim R, y Martin IL. "Ultrastructure of the 5-Hydroxytryptamine₃ Receptor". *J Neurochem*. **1995**; 64: 1401-1405.
- Bouzat C. "Ephedrine Blocks Wild-Type and Long-Lived Mutant Acetylcholine Receptor Channels". *Neuroreport*. **1996**; 8: 317-321.
- Bouzat C, Barrantes F, y Sine S. "Nicotinic Receptor Fourth Transmembrane Domain: Hydrogen Bonding by Conserved Threonine Contributes to Channel Gating Kinetics". *J Gen Physiol*. **2000**; 115: 663-672.
- Bouzat C y Barrantes FJ. "Modulation of Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptors by the Glucocorticoid Hydrocortisone. Possible Allosteric Mechanism of Channel Blockade". *J Biol Chem*. **1996**; 271: 25835-25841.
- Bouzat C, Bartos M, Corradi J, y Sine SM. "The Interface Between Extracellular and Transmembrane Domains of Homomeric Cys-Loop Receptors Governs Open-Channel Lifetime and Rate of Desensitization". *J. Neurosci*. **2008**; 28: 7808-7819.
- Bouzat C, Bren N, y Sine SM. "Structural Basis of the Different Gating Kinetics of Fetal and Adult Acetylcholine Receptors". *Neuron*. **1994**; 13: 1395-1402.
- Bouzat C, Gumilar F, del Carmen EM, y Sine SM. "Subunit-Selective Contribution to Channel Gating of the M4 Domain of the Nicotinic Receptor". *Biophys J*. **2002**; 82: 1920-1929.
- Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang HL, Rayes D, Hansen SB, Taylor P, y Sine SM. "Coupling of Agonist Binding to Channel Gating in an ACh-Binding Protein Linked to an Ion Channel". *Nature*. **2004**; 430: 896-900.
- Bouzat C, Roccamo AM, Garbus I, y Barrantes FJ. "Mutations at Lipid-Exposed Residues of the Acetylcholine Receptor Affect Its Gating Kinetics". *Mol Pharmacol*. **1998**; 54: 146-153.
- Bradley PB, Humphrey PP, y Williams RH. "Evidence for the Existence of 5-Hydroxytryptamine Receptors, Which Are Not of the 5-HT₂ Type, Mediating Contraction of Rabbit Isolated Basilar Artery". *Br J Pharmacol*. **1986**; 87: 3-4.
- Brady CA, Stanford IM, Ali I, Lin L, Williams JM, Dubin AE, Hope AG, y Barnes NM. "Pharmacological Comparison of Human Homomeric 5-HT_{3A} Receptors Versus Heteromeric 5-HT_{3A/3B} Receptors". *Neuropharmacology*. **2001**; 41: 282-284.
- Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der OJ, Smit AB, y Sixma TK. "Crystal Structure of an ACh-Binding Protein Reveals the Ligand-Binding Domain of Nicotinic Receptors". *Nature*. **2001**; 411: 269-276.

- Brown AM, Hope AG, Lambert JJ, y Peters JA. "Ion Permeation and Conduction in a Human Recombinant 5-HT₃ Receptor Subunit (H5-HT_{3A})". *J. Physiol.* **1998**; 507 (Pt 3): 653-665.
- Bruzzone R, White TW, y Paul DL. "Connections With Connexins: the Molecular Basis of Direct Intercellular Signaling". *Eur. J Biochem.* **1996**; 238: 1-27.
- Burley SK y Petsko GA. "Amino-Aromatic Interactions in Proteins". *FEBS Lett.* **1986**; 203: 139-143.
- Burzomato V, Beato M, Groot-Kormelink PJ, Colquhoun D, y Sivilotti LG. "Single-Channel Behavior of Heteromeric Alpha1beta Glycine Receptors: an Attempt to Detect a Conformational Change Before the Channel Opens". *J. Neurosci.* **2004**; 24: 10924-10940.
- Carter PJ, Wilkinson AJ, y Fersht AR. "The Use of Double Mutants to Detect Structural Changes in the Active Site of the Tyrosyl-TRNA Synthetase (*Bacillus Stearotherophilus*)". *Cell.* **1984**; 38: 835-840.
- Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le NN, McIntosh JM, Gardier AM, y Changeux JP. "Subunit Composition of Functional Nicotinic Receptors in Dopaminergic Neurons Investigated With Knock-Out Mice". *J Neurosci.* **2003**; 23: 7820-7829.
- Changeux JP y Edelstein S. "Allosteric Mechanism in Normal and Pathological Nicotinic Acetylcholine Receptors". *Current Opinion in Neurobiology.* **2001**; 11: 369-377.
- Charpentier E, Wiesner A, Huh KH, Ogier R, Hoda JC, Allaman G, Raggenbass M, Feuerbach D, Bertrand D, y Fuhrer C. "Alpha7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Are Negatively Regulated by Tyrosine Phosphorylation and Src-Family Kinases". *J Neurosci.* **2005**; 25: 9836-9849.
- Claudio T, Ballivet M, Patrick J, y Heinemann S. "Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of *Torpedo Californica* Acetylcholine Receptor Gamma Subunit". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**; 80: 1111-1115.
- Clements JD, Feltz A, Sahara Y, y Westbrook GL. "Activation Kinetics of AMPA Receptor Channels Reveal the Number of Functional Agonist Binding Sites". *J. Neurosci.* **1998**; 18: 119-127.
- Clements JD y Westbrook GL. "Activation Kinetics Reveal the Number of Glutamate and Glycine Binding Sites on the N-Methyl-D-Aspartate Receptor". *Neuron.* **1991**; 7: 605-613.
- Colquhoun D. "Agonist-Activated Ion Channels". *Br. J. Pharmacol.* **2006**; 147 Suppl 1: S17-S26.
- Colquhoun D y Sakmann B. "Fast Events in Single-Channel Currents Activated by Acetylcholine and Its Analogues at the Frog Muscle End-Plate". *J. Physiol.* **1985**; 369: 501-557.
- Colquhoun D y Sivilotti LG. "Function and Structure in Glycine Receptors and Some of Their Relatives". *Trends Neurosci.* **2004**; 27: 337-344.
- Corradi J, Spitzmaul G, De Rosa MJ, Costabel M, y Bouzat C. "Role of Pairwise Interactions Between M1 and M2 Domains of the Nicotinic Receptor in Channel Gating". *Biophys J.* **2007**; 92: 76-86.

- Cymes GD y Grosman C. "Pore-Opening Mechanism of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Evinced by Proton Transfer". *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**; 15: 389-396.
- Cymes GD, Grosman C, y Auerbach A. "Structure of the Transition State of Gating in the Acetylcholine Receptor Channel Pore: a Phi-Value Analysis". *Biochemistry.* **2002**; 41: 5548-5555.
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, y Kirkness EF. "The 5-HT_{3B} Subunit Is a Major Determinant of Serotonin-Receptor Function". *Nature.* **1999**; 397: 359-363.
- De Rosa MJ, Corradi J, y Bouzat C. "Subunit-Selective Role of the M₃ Transmembrane Domain of the Nicotinic Acetylcholine Receptor in Channel Gating". *Biochim Biophys Acta.* **2008**; 1778: 521-529.
- De Rosa MJ, Esandi MC, Garelli A, Rayes D, y Bouzat C. "Relationship Between Alpha 7 NACHR and Apoptosis in Human Lymphocytes". *J Neuroimmunol.* **2005**; 160: 154-161.
- De Rosa MJ, Rayes D, Spitzmaul G, y Bouzat C. "Nicotinic Receptor M₃ Transmembrane Domain: Position 8' Contributes to Channel Gating". *Mol Pharmacol.* **2002**; 62: 406-414.
- Deeb TZ, Carland JE, Cooper MA, Livesey MR, Lambert JJ, Peters JA, y Hales TG. "Dynamic Modification of a Mutant Cytoplasmic Cysteine Residue Modulates the Conductance of the Human 5-HT_{3A} Receptor". *J Biol Chem.* **2007**; 282: 6172-6182.
- Del-Castillo J y Katz B. "A Comparison of Acetylcholine and Stable Depolarizing Agents". *Proc R. Soc. Lond B Biol Sci.* **1957**; 146: 362-368.
- Dennis M, Giraudat J, Kotzyba-Hibert F, Goeldner M, Hirth C, Chang JY, Lazure C, Chretien M, y Changeux JP. "Amino Acids of the Torpedo Marmorata Acetylcholine Receptor Alpha Subunit Labeled by a Photoaffinity Ligand for the Acetylcholine Binding Site". *Biochemistry.* **1988**; 27: 2346-2357.
- Derkach V, Surprenant A, y North RA. "5-HT₃ Receptors Are Membrane Ion Channels". *Nature.* **1989**; 339: 706-709.
- Dickinson JA, Kew JN, y Wonnacott S. "Presynaptic {Alpha}7 and {Beta}2-Containing Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Excitatory Amino Acid Release From Rat Prefrontal Cortex Nerve Terminals Via Distinct Cellular Mechanisms". *Mol Pharmacol.* **2008**; 29: En prensa.
- Dilger JP, Boguslavsky R, Barann M, Katz T, y Vidal AM. "Mechanisms of Barbiturate Inhibition of Acetylcholine Receptor Channels". *J Gen Physiol.* **1997**; 109: 401-414.
- Dilger JP y Liu Y. "Desensitization of Acetylcholine Receptors in BC3H-1 Cells". *Pflugers Arch.* **1992**; 420: 479-485.
- Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, Wilson SJ, Galindo JE, Glass CA, Luo L, Jackson MR, Lovenberg TW, y Erlander MG. "The Pharmacological and Functional Characteristics of the Serotonin 5-HT_{3A} Receptor Are Specifically Modified by a 5-HT_{3B} Receptor Subunit". *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 30799-30810.

- Eisele JL, Bertrand S, Galzi JL, villers-Thierry A, Changeux JP, y Bertrand D. "Chimaeric Nicotinic-Serotonergic Receptor Combines Distinct Ligand Binding and Channel Specificities". *Nature*. **1993**; 366: 479-483.
- Engel AG, Ohno K, Bouzat C, Sine SM, y Griggs RC. "End-Plate Acetylcholine Receptor Deficiency Due to Nonsense Mutations in the Epsilon Subunit". *Ann Neurol*. **1996a**; 40: 810-817.
- Engel AG, Ohno K, Milone M, Wang HL, Nakano S, Bouzat C, Pruitt JN, Hutchinson DO, Brengman JM, Bren N, Sieb JP, y Sine SM. "New Mutations in Acetylcholine Receptor Subunit Genes Reveal Heterogeneity in the Slow-Channel Congenital Myasthenic Syndrome". *Hum Mol Genet*. **1996b**; 5: 1217-1227.
- Engelman DM, Steitz TA, y Goldman A. "Identifying Nonpolar Transbilayer Helices in Amino Acid Sequences of Membrane Proteins". *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem*. **1986**; 15: 321-353.
- Erreger K, Geballe MT, Dravid SM, Snyder JP, Wyllie DJ, y Traynelis SF. "Mechanism of Partial Agonism at NMDA Receptors for a Conformationally Restricted Glutamate Analog". *J Neurosci*. **2005**; 25: 7858-7866.
- Felder C.C. "Muscarinic Acetylcholine Receptors: Signal Transduction Through Multiple Effectors". *FASEB J*. **1995**; 9: 619-625.
- Franke C, Hatt H, y Dudel J. "Steep Concentration Dependence and Fast Desensitization of Nicotinic Channel Currents Elicited by Acetylcholine Pulses, Studied in Adult Vertebrate Muscle". *Pflugers Arch*. **1991**; 417: 509-516.
- Franke C, Parnas H, Hovav G, y Dudel J. "A Molecular Scheme for the Reaction Between Acetylcholine and Nicotinic Channels". *Biophys. J*. **1993**; 64: 339-356.
- Fu DX y Sine SM. "Competitive Antagonists Bridge the Alpha-Gamma Subunit Interface of the Acetylcholine Receptor Through Quaternary Ammonium-Aromatic Interactions". *J. Biol. Chem*. **1994**; 269: 26152-26157.
- Gaddum JH y Picarelli ZP. "Two Kinds of Tryptamine Receptor". *Br J Pharmacol Chemother*. **1957**; 12: 323-328.
- Galzi JL, Revah F, Bouet F, Menez A, Goeldner M, Hirth C, y Changeux JP. "Allosteric Transitions of the Acetylcholine Receptor Probed at the Amino Acid Level With a Photolabile Cholinergic Ligand". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **1991**; 88: 5051-5055.
- Gillette R. "Evolution and Function in Serotonergic System". *Integrative and Comparative Biology*. **2006**; 46: 838-846.
- Giniatullin R, Nistri A, y Yakel JL. "Desensitization of Nicotinic ACh Receptors: Shaping Cholinergic Signaling". *Trends Neurosci*. **2005**; 28: 371-378.
- Giraudat J, Dennis M, Heidmann T, Chang JY, y Changeux JP. "Structure of the High-Affinity Binding Site for Noncompetitive Blockers of the Acetylcholine Receptor: Serine-262 of the Delta Subunit Is Labeled by [3H]Chlorpromazine". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1986**; 83: 2719-2723.
- Giraudat J, villers-Thierry A, Auffray C, Rougeon F, y Changeux JP. "Identification of a cDNA Clone Coding for the Acetylcholine Binding Subunit of Torpedo Marmorata Acetylcholine Receptor". *EMBO J*. **1982**; 1: 713-717.

- Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F, y Zoli M. "*Heterogeneity and Complexity of Native Brain Nicotinic Receptors*". *Biochem. Pharmacol.* **2007**; 74: 1102-1111.
- Green WN y Wanamaker CP. "*Formation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Binding Sites*". *J. Neurosci.* **1998**; 18: 5555-5564.
- Grosman C. "*Linear Free-Energy Relationship and the Dynamics of Gating in the Acetylcholine Receptor Channel*". *Journal of Biological Physics.* **2002**; 28: 267-277.
- Grosman C y Auerbach A. "*Asymmetric and Independent Contribution of the Second Transmembrane Segment 12' Residues to Diliganded Gating of Acetylcholine Receptor Channels: a Single-Channel Study With Choline As the Agonist*". *J Gen Physiol.* **2000a**; 115: 637-651.
- Grosman C y Auerbach A. "*Kinetic, Mechanistic, and Structural Aspects of Unliganded Gating of Acetylcholine Receptor Channels: a Single-Channel Study of Second Transmembrane Segment 12' Mutants*". *J Gen Physiol.* **2000b**; 115: 621-635.
- Grosman C y Auerbach A. "*The Dissociation of Acetylcholine From Open Nicotinic Receptor Channels*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**; 98: 14102-14107.
- Grosman C, Zhou M, y Auerbach A. "*Mapping the Conformational Wave of Acetylcholine Receptor Channel Gating*". *Nature.* **2000**; 403: 773-776.
- Grutter T, de Carvalho LP, Dufresne V, Taly A, Edelstein SJ, y Changeux JP. "*Molecular Tuning of Fast Gating in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**; 102: 18207-18212.
- Gumilar F, Arias HR, Spitzmaul G, y Bouzat C. "*Molecular Mechanisms of Inhibition of Nicotinic Acetylcholine Receptors by Tricyclic Antidepressants*". *Neuropharmacology.* **2003**; 45: 964-976.
- Gumilar F y Bouzat C. "*Tricyclic Antidepressants Inhibit Homomeric Cys-Loop Receptors by Acting at Different Conformational States*". *Eur. J Pharmacol.* **2008**; 584: 30-39.
- Hales TG, Dunlop JI, Deeb TZ, Carland JE, Kelley SP, Lambert JJ, y Peters JA. "*Common Determinants of Single Channel Conductance Within the Large Cytoplasmic Loop of 5-Hydroxytryptamine Type 3 and Alpha4beta2 Nicotinic Acetylcholine Receptors*". *J Biol. Chem.* **2006**; 281: 8062-8071.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, y Sigworth FJ. "*Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording From Cells and Cell-Free Membrane Patches*". *Pflugers Arch.* **1981**; 391: 85-100.
- Hanna MC, Davies PA, Hales TG, y Kirkness EF. "*Evidence for Expression of Heteromeric Serotonin 5-HT(3) Receptors in Rodents*". *J Neurochem.* **2000**; 75: 240-247.
- Hannon J. y Hoyer D. "*Serotonin Receptors and Systems: Endless Diversity?*". *Acta Biologica Szegediensis.* **2002**; 46: 1-12.
- Hapfelmeier G, Tredt C, Haseneder R, Zieglgansberger W, Eisensamer B, Rupprecht R, y Rammes G. "*Co-Expression of the 5-HT3B Serotonin Receptor Subunit Alters the Biophysics of the 5-HT3 Receptor*". *Biophys. J.* **2003**; 84: 1720-1733.
- Hatton CJ, Shelley C, Brydson M, Beeson D, y Colquhoun D. "*Properties of the Human Muscle Nicotinic Receptor, and of the Slow-Channel Myasthenic Syndrome Mutant*".

-
- EpsilonL221F, Inferred From Maximum Likelihood Fits*. J Physiol. **2003**; 547: 729-760.
- Hidalgo P y MacKinnon R. "Revealing the Architecture of a K⁺ Channel Pore Through Mutant Cycles With a Peptide Inhibitor". Science. **1995**; 268: 307-310.
- Hilf RJ y Dutzler R. "Structure of a Potentially Open State of a Proton-Activated Pentameric Ligand-Gated Ion Channel". Nature. **2008a**.
- Hilf RJ y Dutzler R. "X-Ray Structure of a Prokaryotic Pentameric Ligand-Gated Ion Channel". Nature. **2008b**; 452: 375-379.
- Horovitz A. "Double-Mutant Cycles: a Powerful Tool for Analyzing Protein Structure and Function". Fold. Des. **1996**; 1: R121-R126.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, y Humphrey PP. "International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin)". Pharmacol Rev. **1994**; 46: 157-203.
- Hu XQ y Lovinger DM. "Role of Aspartate 298 in Mouse 5-HT_{3A} Receptor Gating and Modulation by Extracellular Ca²⁺". J Physiol. **2005**; 568: 381-396.
- Hu XQ, Sun H, Peoples RW, Hong R, y Zhang L. "An Interaction Involving an Arginine Residue in the Cytoplasmic Domain of the 5-HT_{3A} Receptor Contributes to Receptor Desensitization Mechanism". J. Biol. Chem. **2006**; 281: 21781-21788.
- Hu XQ, Zhang L, Stewart RR, y Weight FF. "Arginine 222 in the Pre-Transmembrane Domain 1 of 5-HT_{3A} Receptors Links Agonist Binding to Channel Gating". J Biol. Chem. **2003**; 278: 46583-46589.
- Hucho F, Oberthur W, y Lottspeich F. "The Ion Channel of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Is Formed by the Homologous Helices M II of the Receptor Subunits". FEBS Lett. **1986**; 205: 137-142.
- Humphrey W, Dalke A, y Schulten K. "VMD: Visual Molecular Dynamics". J Mol Graph. **1996**; 14: 33-38.
- Hunter CA, Singh J, y Thornton JM. "Pi-Pi Interactions: the Geometry and Energetics of Phenylalanine-Phenylalanine Interactions in Proteins". J Mol Biol. **1991**; 218: 837-846.
- Hussy N, Lukas W, y Jones KA. "Functional Properties of a Cloned 5-Hydroxytryptamine Ionotropic Receptor Subunit: Comparison With Native Mouse Receptors". J Physiol. **1994**; 481 (Pt 2): 311-323.
- Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, Bujo H, Mori Y, Fukuda K, y Numa S. "Rings of Negatively Charged Amino Acids Determine the Acetylcholine Receptor Channel Conductance". Nature. **1988**; 335: 645-648.
- Imoto K, Methfessel C, Sakmann B, Mishina M, Mori Y, Konno T, Fukuda K, Kurasaki M, Bujo H, Fujita Y, y . "Location of a Delta-Subunit Region Determining Ion Transport Through the Acetylcholine Receptor Channel". Nature. **1986**; 324: 670-674.
- Jackson M.B. "Ion Channels. Single-Channel Analysis". Methods Enzymol. **1992**; 207: 729-746.
-

- Jackson MB, Wong BS, Morris CE, Lecar H, y Christian CN. "Successive Openings of the Same Acetylcholine Receptor Channel Are Correlated in Open Time". *Biophys. J.* **1983**; 42: 109-114.
- Jansen M, Bali M, y Akabas MH. "Modular Design of Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channels: Functional 5-HT₃ and GABA Rho1 Receptors Lacking the Large Cytoplasmic M3M4 Loop". *J. Gen. Physiol.* **2008**; 131: 137-146.
- Jha A, Cadugan DJ, Purohit P, y Auerbach A. "Acetylcholine Receptor Gating at Extracellular Transmembrane Domain Interface: the Cys-Loop and M2-M3 Linker". *J. Gen. Physiol.* **2007**; 130: 547-558.
- Jones AK, Elgar G, y Sattelle DB. "The Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family of the Pufferfish, *Fugu Rubripes*". *Genomics.* **2003**; 82: 441-451.
- Jones TA, Zou JY, Cowan SW, y Kjeldgaard. "Improved Methods for Building Protein Models in Electron Density Maps and the Location of Errors in These Models". *Acta Crystallogr. A.* **1991**; 47 (Pt 2): 110-119.
- Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M, y Tzartos SJ. "Muscle and Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. Structure, Function and Pathogenicity". *FEBS J.* **2007**; 274: 3799-3845.
- Karlin A. "Chemical Distinctions Between Acetylcholinesterase and the Acetylcholine Receptor". *Biochim. Biophys. Acta.* **1967a**; 139: 358-362.
- Karlin A. "On the Application of "a Plausible Model" of Allosteric Proteins to the Receptor for Acetylcholine". *J. Theor. Biol.* **1967b**; 16: 306-320.
- Karlin A y Akabas MH. "Toward a Structural Basis for the Function of Nicotinic Acetylcholine Receptors and Their Cousins". *Neuron.* **1995**; 15: 1231-1244.
- Kash TL, Jenkins A, Kelley JC, Trudell JR, y Harrison NL. "Coupling of Agonist Binding to Channel Gating in the GABA(A) Receptor". *Nature.* **2003**; 421: 272-275.
- Kawashima K y Fujii T. "Basic and Clinical Aspects of Non-Neuronal Acetylcholine: Overview of Non-Neuronal Cholinergic Systems and Their Biological Significance". *J Pharmacol Sci.* **2008**; 106: 167-173.
- Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, y Peters JA. "A Cytoplasmic Region Determines Single-Channel Conductance in 5-HT₃ Receptors". *Nature.* **2003**; 424: 321-324.
- Kihara T, Shimohama S, Sawada H, Honda K, Nakamizo T, Shibasaki H, Kume T, y Akaike A. "Alpha 7 Nicotinic Receptor Transduces Signals to Phosphatidylinositol 3-Kinase to Block A Beta-Amyloid-Induced Neurotoxicity". *J Biol Chem.* **2001**; 276: 13541-13546.
- Kim S, Chamberlain AK, y Bowie JU. "A Simple Method for Modeling Transmembrane Helix Oligomers". *J. Mol. Biol.* **2003**; 329: 831-840.
- Kim S, Chamberlain AK, y Bowie JU. "A Model of the Closed Form of the Nicotinic Acetylcholine Receptor M2 Channel Pore". *Biophys. J.* **2004**; 87: 792-799.
- Krause RM, Buisson B, Bertrand S, Corringer PJ, Galzi JL, Changeux JP, y Bertrand D. "Ivermectin: a Positive Allosteric Effector of the Alpha7 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor". *Mol Pharmacol.* **1998**; 53: 283-294.

- Kriegler S, Sudweeks S, y Yakel JL. "MTSEA Potentiates 5-HT₃ Receptors Containing the Nicotinic Alpha4 Subunit". *Neuropharmacology*. **1999**; 38: 1913-1915.
- Kwan AC, Chau TN, Tong WL, Tsang OT, Tso EY, Chiu MC, Yu WC, y Lai TS. "Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Diarrhea". *J Gastroenterol. Hepatol*. **2005**; 20: 606-610.
- Lape R, Colquhoun D, y Sivilotti LG. "On the Nature of Partial Agonism in the Nicotinic Receptor Superfamily". *Nature*. **2008**; 454:722-727.
- Laporte AM, Koscielniak T, Ponchant M, Verge D, Hamon M, y Gozlan H. "Quantitative Autoradiographic Mapping of 5-HT₃ Receptors in the Rat CNS Using [¹²⁵I]Iodo-Zacopride and [³H]Zacopride As Radioligands". *Synapse*. **1992**; 10: 271-281.
- Lasalde JA, Tamamizu S, Butler DH, Vibat CR, Hung B, y McNamee MG. "Tryptophan Substitutions at the Lipid-Exposed Transmembrane Segment M4 of *Torpedo Californica* Acetylcholine Receptor Govern Channel Gating". *Biochemistry*. **1996**; 35: 14139-14148.
- Laskowski RA, Moss DS, y Thornton JM. "Main-Chain Bond Lengths and Bond Angles in Protein Structures". *J. Mol. Biol*. **1993**; 231: 1049-1067.
- Lee WY y Sine SM. "Principal Pathway Coupling Agonist Binding to Channel Gating in Nicotinic Receptors". *Nature*. **2005**; 438: 243-247.
- Lee YH, Li L, Lasalde J, Rojas L, McNamee M, Ortiz-Miranda SI, y Pappone P. "Mutations in the M4 Domain of *Torpedo Californica* Acetylcholine Receptor Dramatically Alter Ion Channel Function". *Biophys. J*. **1994**; 66: 646-653.
- Legendre P. "A Reluctant Gating Mode of Glycine Receptor Channels Determines the Time Course of Inhibitory Miniature Synaptic Events in Zebrafish Hindbrain Neurons". *J. Neurosci*. **1998**; 18: 2856-2870.
- Lena C, de Kerchove D'E, Cordero-Erausquin M, Le NN, del MA-J, y Changeux JP. "Diversity and Distribution of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Locus Coeruleus Neurons". *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999**; 12;96: 12126-12131.
- Lester H.A. "The Permeation Pathway of Neurotransmitter-Gated Ion Channels". *Annu. Rev Biophys Biomol. Struct.* **1992**; 21: 267-292.
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, y Dougherty DA. "Cys-Loop Receptors: New Twists and Turns". *Trends Neurosci*. **2004**; 27: 329-336.
- Livesey MR, Cooper MA, Deeb TZ, Carland JE, Kozuska J, Hales TG, Lambert JJ, y Peters JA. "Structural Determinants of Ca²⁺ Permeability and Conduction in the Human 5-Hydroxytryptamine Type 3A Receptor". *J. Biol. Chem*. **2008**; 283: 19301-19313.
- Lo DC, Pinkham JL, y Stevens CF. "Role of a Key Cysteine Residue in the Gating of the Acetylcholine Receptor". *Neuron*. **1991**; 6: 31-40.
- Lobitz N, Gisselmann G, Hatt H, y Wetzel CH. "A Single Amino-Acid in the TM1 Domain Is an Important Determinant of the Desensitization Kinetics of Recombinant Human and Guinea Pig Alpha-Homomeric 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptors". *Mol Pharmacol*. **2001**; 59: 844-851.

- Loewi O y Navratil E. "Ueber Hormonale. Uebertragbarkeit Der Herznervenwirkung. (Mitteilung X). Ueber Das Schicksal Des Vagusstoff. Pflugers Arch. Gesamte". *Physiol.* **1926**; 214: 678-688.
- Lummis S.C. "The Transmembrane Domain of the 5-HT₃ Receptor: Its Role in Selectivity and Gating". *Biochem. Soc. Trans.* **2004**; 32: 535-539.
- Lummis SC, Beene DL, Lee LW, Lester HA, Broadhurst RW, y Dougherty DA. "Cis-Trans Isomerization at a Proline Opens the Pore of a Neurotransmitter-Gated Ion Channel". *Nature.* **2005**; 438: 248-252.
- MacKinnon R. "Pore Loops: an Emerging Theme in Ion Channel Structure". *Neuron.* **1995**; 14: 889-892.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, y Julius D. "Primary Structure and Functional Expression of the 5HT₃ Receptor, a Serotonin-Gated Ion Channel". *Science.* **1991**; 254: 432-437.
- Marx A, O'Connor R, Geuder KI, Hoppe F, Schalke B, Tzartos S, Kalies I, Kirchner T, y Muller-Hermelink HK. "Characterization of a Protein With an Acetylcholine Receptor Epitope From Myasthenia Gravis-Associated Thymomas". *Lab Invest.* **1990**; 62: 279-286.
- Middleton RE y Cohen JB. "Mapping of the Acetylcholine Binding Site of the Nicotinic Acetylcholine Receptor: [3H]Nicotine As an Agonist Photoaffinity Label". *Biochemistry.* **1991**; 30: 6987-6997.
- Mihovilovic M, Denning S, Mai Y, Fisher CM, Whichard LP, Patel DD, y Roses AD. "Thymocytes and Cultured Thymic Epithelial Cells Express Transcripts Encoding Alpha-3, Alpha-5, and Beta-4 Subunits of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. Preferential Transcription of the Alpha-3 and Beta-4 Genes by Immature CD4+8+ Thymocytes and Evidence for Response to Nicotine in Thymocytes". *Ann N Y Acad Sci.* **1998**; 841: 388-392.
- Mike A, Castro NG, y Albuquerque EX. "Choline and Acetylcholine Have Similar Kinetic Properties of Activation and Desensitization on the Alpha7 Nicotinic Receptors in Rat Hippocampal Neurons". *Brain Res.* **2000**; 882: 155-168.
- Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, y Sakmann B. "Molecular Distinction Between Fetal and Adult Forms of Muscle Acetylcholine Receptor". *Nature.* **1986**; 321: 406-411.
- Missias AC, Chu GC, Klocke BJ, Sanes J, y Merlie JP. "Maturation of the Acetylcholine Receptor in Skeletal Muscle: Regulation of the AChR Gamma-to-Epsilon Switch". *Dev Biol.* **1996**; 179: 223-238.
- Mitra A, Bailey TD, y Auerbach AL. "Structural Dynamics of the M4 Transmembrane Segment During Acetylcholine Receptor Gating". *Structure.* **2004**; 12: 1909-1918.
- Mitra A, Cymes GD, y Auerbach A. "Dynamics of the Acetylcholine Receptor Pore at the Gating Transition State". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**; 102: 15069-15074.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, y Unwin N. "Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4.6 A Resolution: Transverse Tunnels in the Channel Wall". *J Mol Biol.* **1999**; 288: 765-786.

- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, y Unwin N. "Structure and Gating Mechanism of the Acetylcholine Receptor Pore". *Nature*. **2003**; 423: 949-955.
- Monod J, WYMAN J, y Changeux JP. "ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL". *J. Mol. Biol.* **1965**; 12: 88-118.
- Mott DD, Erreger K, Banke TG, y Traynelis SF. "Open Probability of Homomeric Murine 5-HT_{3A} Serotonin Receptors Depends on Subunit Occupancy". *J Physiol*. **2001**; 535: 427-443.
- Mukhtasimova N y Sine SM. "An Intersubunit Trigger of Channel Gating in the Muscle Nicotinic Receptor". *J. Neurosci.* **2007**; 27: 4110-4119.
- Murshudov GN, Vagin AA, y Dodson EJ. "Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method". *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1997**; 53: 240-255.
- Nakamizo T, Kawamata J, Yamashita H, Kanki R, Kihara T, Sawada H, Akaike A, y Shimohama S. "Stimulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors Protects Motor Neurons". *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 May. **2005**; 330: 1285-1289.
- Neher E y Steinbach JH. "Local Anaesthetics Transiently Block Currents Through Single Acetylcholine-Receptor Channels". *J. Physiol.* **1978**; 277: 153-176.
- Neijt HC, Plomp JJ, y Vijverberg HP. "Kinetics of the Membrane Current Mediated by Serotonin 5-HT₃ Receptors in Cultured Mouse Neuroblastoma Cells". *J Physiol*. **1989**; 411: 257-269.
- Niesler B, Frank B, Kapeller J, y Rappold GA. "Cloning, Physical Mapping and Expression Analysis of the Human 5-HT₃ Serotonin Receptor-Like Genes HTR3C, HTR3D and HTR3E". *Gene*. **2003**; 310: 101-111.
- Niesler B, Kapeller J, Hammer C, y Rappold G. "Serotonin Type 3 Receptor Genes: HTR3A, B, C, D, E". *Pharmacogenomics*. **2008**; 9: 501-504.
- Niesler B, Walstab J, Combrink S, Moller D, Kapeller J, Rietdorf J, Bonisch H, Gothert M, Rappold G, y Bruss M. "Characterization of the Novel Human Serotonin Receptor Subunits 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, and 5-HT_{3E}". *Mol. Pharmacol.* **2007**; 72: 8-17.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Miyata T, y Numa S. "Primary Structure of Alpha-Subunit Precursor of Torpedo Californica Acetylcholine Receptor Deduced From cDNA Sequence". *Nature*. **1982**; 299: 793-797.
- Okamura Y, Nishino A, Murata Y, Nakajo K, Iwasaki H, Ohtsuka Y, Tanaka-Kunishima M, Takahashi N, Hara Y, Yoshida T, Nishida M, Okado H, Watari H, Meinertzhagen IA, Satoh N, Takahashi K, Satou Y, Okada Y, y Mori Y. "Comprehensive Analysis of the Ascidian Genome Reveals Novel Insights into the Molecular Evolution of Ion Channel Genes". *Physiol Genomics*. **2005**; 22: 269-282.
- Ortiz-Miranda SI, Lasalde JA, Pappone PA, y McNamee MG. "Mutations in the M4 Domain of the Torpedo Californica Nicotinic Acetylcholine Receptor Alter Channel Opening and Closing". *J. Membr. Biol.* **1997**; 158: 17-30.
- Oz M, Zhang L, y Spivak CE. "Direct Noncompetitive Inhibition of 5-HT(3) Receptor-Mediated Responses by Forskolin and Steroids". *Arch Biochem Biophys*. **2002**; 404: 293-301.

- Paas Y, Gibor G, Grailhe R, Savatier-Duclert N, Dufresne V, Sunesen M, de Carvalho LP, Changeux JP, y Attali B. "Pore Conformations and Gating Mechanism of a Cys-Loop Receptor". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **2005**; 102: 15877-15882.
- Panicker S, Cruz H, Arrabit C, y Slesinger PA. "Evidence for a Centrally Located Gate in the Pore of a Serotonin-Gated Ion Channel". J. Neurosci. **2002**; 22: 1629-1639.
- Papke RL, Meyer E, Nutter T, y Uteshev VV. "Alpha7 Receptor-Selective Agonists and Modes of Alpha7 Receptor Activation". Eur. J. Pharmacol. **2000**; 393: 179-195.
- Papke RL y Oswald RE. "Mechanisms of Noncompetitive Inhibition of Acetylcholine-Induced Single-Channel Currents". J. Gen. Physiol. **1989**; 93: 785-811.
- Paradiso K y Brehm P. "Long-Term Desensitization of Nicotinic Acetylcholine Receptors Is Regulated Via Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation". J. Neurosci. **1998**; 18: 9227-9237.
- Paradiso K, Zhang J, y Steinbach JH. "The C Terminus of the Human Nicotinic Alpha4beta2 Receptor Forms a Binding Site Required for Potentiation by an Estrogenic Steroid". J Neurosci. **2001**; 21: 6561-6568.
- Pedersen SE y Cohen JB. "D-Tubocurarine Binding Sites Are Located at Alpha-Gamma and Alpha-Delta Subunit Interfaces of the Nicotinic Acetylcholine Receptor". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1990**; 87: 2785-2789.
- Peroutka S.J. "5-Hydroxytryptamine Receptors in Vertebrates and Invertebrates: Why Are There So Many?". Neurochem. Int. **1994**; 25: 533-536.
- Peters JA, Carland JE, Cooper MA, Livesey MR, Deeb TZ, Hales TG, y Lambert JJ. "Novel Structural Determinants of Single-Channel Conductance in Nicotinic Acetylcholine and 5-Hydroxytryptamine Type-3 Receptors". Biochem Soc. Trans. **2006**; 34: 882-886.
- Peters JA, Hales TG, y Lambert JJ. "Molecular Determinants of Single-Channel Conductance and Ion Selectivity in the Cys-Loop Family: Insights From the 5-HT3 Receptor". Trends Pharmacol Sci. **2005**; 26: 587-594.
- Plazas PV, De Rosa MJ, Gomez-Casati ME, Verbitsky M, Weisstaub N, Katz E, Bouzat C, y Elgoyhen AB. "Key Roles of Hydrophobic Rings of TM2 in Gating of the Alpha9alpha10 Nicotinic Cholinergic Receptor". Br J Pharmacol. **2005**; 145: 963-974.
- Prince RJ y Sine SM. "Molecular Dissection of Subunit Interfaces in the Acetylcholine Receptor. Identification of Residues That Determine Agonist Selectivity". J. Biol. Chem. **1996**; 271: 25770-25777.
- Purohit P y Auerbach A. "Acetylcholine Receptor Gating: Movement in the Alpha-Subunit Extracellular Domain". J Gen Physiol. **2007**; 130: 569-579.
- Purohit P, Mitra A, y Auerbach A. "A Stepwise Mechanism for Acetylcholine Receptor Channel Gating". Nature. **2007**; 446: 930-933.
- Purves R.D. "Function of Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptors". Nature. **1976**; 261: 149-151.

- Qin F, Auerbach A, y Sachs F. "Estimating Single-Channel Kinetic Parameters From Idealized Patch-Clamp Data Containing Missed Events". *Biophys. J.* **1996**; 70: 264-280.
- Quick MW y Lester RA. "Desensitization of Neuronal Nicotinic Receptors". *J. Neurobiol.* **2002**; 53: 457-478.
- Raftery MA, Elliott J, Moore HP, Hartig P, y Wu WC. "Molecular Interactions of Torpedo Californica Acetylcholine Receptor in a Highly Purified Membrane-Bound Form". *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **1980a**; 21: 1-9.
- Raftery MA, Hunkapiller MW, Strader CD, y Hood LE. "Acetylcholine Receptor: Complex of Homologous Subunits". *Science.* **1980b**; 208: 1454-1456.
- Raves D, Spitzmaul G, Sine SM, y Bouzat C. "Single-Channel Kinetic Analysis of Chimeric Alpha7-5HT3A Receptors". *Mol Pharmacol.* **2005**; 68: 1475-1483.
- Reeves DC, Goren EN, Akabas MH, y Lummis SC. "Structural and Electrostatic Properties of the 5-HT3 Receptor Pore Revealed by Substituted Cysteine Accessibility Mutagenesis". *J Biol Chem.* **2001**; 276: 42035-42042.
- Reeves DC, Jansen M, Bali M, Lemster T, y Akabas MH. "A Role for the Beta 1-Beta 2 Loop in the Gating of 5-HT3 Receptors". *J Neurosci.* **2005**; 25: 9358-9366.
- Ridder A, Skupjen P, Unterreitmeier S, y Langosch D. "Tryptophan Supports Interaction of Transmembrane Helices". *J Mol Biol.* **2005**; 354: 894-902.
- Sakmann B, Patlak J, y Neher E. "Single Acetylcholine-Activated Channels Show Burst-Kinetics in Presence of Desensitizing Concentrations of Agonist". *Nature.* **1980**; 286: 71-73.
- Salamone FN, Zhou M, y Auerbach A. "A Re-Examination of Adult Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor Channel Activation Kinetics". *J. Physiol.* **1999**; 516 (Pt 2): 315-330.
- Schreiber G y Fersht AR. "Energetics of Protein-Protein Interactions: Analysis of the Barnase-Barstar Interface by Single Mutations and Double Mutant Cycles". *J Mol Biol.* **1995**; 248: 478-486.
- Sine S.M. "The Nicotinic Receptor Ligand Binding Domain". *J. Neurobiol.* **2002**; 53: 431-446.
- Sine SM y Claudio T. "Gamma- and Delta-Subunits Regulate the Affinity and the Cooperativity of Ligand Binding to the Acetylcholine Receptor". *J. Biol. Chem.* **1991**; 266: 19369-19377.
- Sine SM, Claudio T, y Sigworth FJ. "Activation of Torpedo Acetylcholine Receptors Expressed in Mouse Fibroblasts. Single Channel Current Kinetics Reveal Distinct Agonist Binding Affinities". *J. Gen. Physiol.* **1990**; 96: 395-437.
- Sine SM y Engel AG. "Recent Advances in Cys-Loop Receptor Structure and Function". *Nature.* **2006**; 440: 448-455.
- Sine SM, Ohno K, Bouzat C, Auerbach A, Milone M, Pruitt JN, y Engel AG. "Mutation of the Acetylcholine Receptor Alpha Subunit Causes a Slow-Channel Myasthenic Syndrome by Enhancing Agonist Binding Affinity". *Neuron.* **1995**; 15: 229-239.

- Sine SM, Shen XM, Wang HL, Ohno K, Lee WY, Tsujino A, Brengmann J, Bren N, Vajsar J, y Engel AG. "Naturally Occurring Mutations at the Acetylcholine Receptor Binding Site Independently Alter ACh Binding and Channel Gating". *J. Gen. Physiol.* **2002**; 120: 483-496.
- Sine SM y Taylor P. "Relationship Between Reversible Antagonist Occupancy and the Functional Capacity of the Acetylcholine Receptor". *J. Biol. Chem.* **1981**; 256: 6692-6699.
- Singh J. y Thornton J.M. "The Interaction Between Phenylalanine Rings in Proteins". *FEBS J.* **1985**; 191: 1-6.
- Sinnokrot MO y Sherrill CD. "Substituent Effects in Pi-Pi Interactions: Sandwich and T-Shaped Configurations". *J. Am. Chem. Soc.* **2004**; 126: 7690-7697.
- Solt K, Ruesch D, Forman SA, Davies PA, y Raines DE. "Differential Effects of Serotonin and Dopamine on Human 5-HT3A Receptor Kinetics: Interpretation Within an Allosteric Kinetic Model". *J Neurosci.* **2007**; 27: 13151-13160.
- Spitzmaul G, Corradi J, y Bouzat C. "Mechanistic Contributions of Residues in the M1 Transmembrane Domain of the Nicotinic Receptor to Channel Gating". *Mol Membr Biol.* **2004**; 21: 39-50.
- Spitzmaul G, Dilger JP, y Bouzat C. "The Noncompetitive Inhibitor Quinacrine Modifies the Desensitization Kinetics of Muscle Acetylcholine Receptors". *Mol Pharmacol.* **2001**; 60: 235-243.
- Stollar EJ, Gelpi JL, Velankar S, Golovin A, Orozco M, y Luisi BF. "Unconventional Interactions Between Water and Heterocyclic Nitrogens in Protein Structures". *Proteins.* **2004**; 57: 1-8.
- Tasneem A, Iyer LM, Jakobsson E, y Aravind L. "Identification of the Prokaryotic Ligand-Gated Ion Channels and Their Implications for the Mechanisms and Origins of Animal Cys-Loop Ion Channels". *Genome Biol.* **2005**; 6: R4.
- Thompson AJ y Lummis SC. "The 5-HT3 Receptor As a Therapeutic Target". *Expert Opin. Ther. Targets.* **2007**; 11: 527-540.
- Unwin N. "Nicotinic Acetylcholine Receptor at 9 Å Resolution". *J Mol Biol.* **1993**; 229: 1101-1124.
- Unwin N. "Acetylcholine Receptor Channel Imaged in the Open State". *Nature.* **1995**; 373: 37-43.
- Unwin N. "Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4Å Resolution". *J Mol Biol.* **2005**; 346: 967-989.
- Unwin N, Miyazawa A, Li J, y Fujiyoshi Y. "Activation of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Involves a Switch in Conformation of the Alpha Subunits". *J Mol Biol.* **2002**; 319: 1165-1176.
- Uphouse L. "Multiple Serotonin Receptors: Too Many, Not Enough, or Just the Right Number?". *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1997**; 21: 679-698.
- Valera S, Ballivet M, y Bertrand D. "Progesterone Modulates a Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1992**; 89: 9949-9953.

- van Hooft JA, Kreikamp AP, y Vijverberg HP. "Native Serotonin 5-HT₃ Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes Differ From Homopentameric 5-HT₃ Receptors". *J. Neurochem.* **1997**; 69: 1318-1321.
- van Hooft JA, Spier AD, Yakel JL, Lummis SC, y Vijverberg HP. "Promiscuous Coassembly of Serotonin 5-HT₃ and Nicotinic Alpha₄ Receptor Subunits into Ca²⁺-Permeable Ion Channels". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**; 95: 11456-11461.
- van Hooft JA y Vijverberg HP. "Selection of Distinct Conformational States of the 5-HT₃ Receptor by Full and Partial Agonists". *Br. J. Pharmacol.* **1996**; 117: 839-846.
- van Hooft JA y Vijverberg HP. "5-HT₃ Receptors and Neurotransmitter Release in the CNS: a Nerve Ending Story?". *Trends Neurosci.* **2000**; 23: 605-610.
- Wang HL, Auerbach A, Bren N, Ohno K, Engel AG, y Sine SM. "Mutation in the M1 Domain of the Acetylcholine Receptor Alpha Subunit Decreases the Rate of Agonist Dissociation". *J Gen Physiol.* **1997**; 109: 757-766.
- Wonnacott S, Barik J, Dickinson J, y Jones IW. "Nicotinic Receptors Modulate Transmitter Cross Talk in the CNS: Nicotinic Modulation of Transmitters". *J Mol Neurosci.* **2006**; 30: 137-140.
- Yakel JL y Jackson MB. "5-HT₃ Receptors Mediate Rapid Responses in Cultured Hippocampus and a Clonal Cell Line". *Neuron.* **1988**; 1: 615-621.
- Yakel JL, Shao XM, y Jackson MB. "Activation and Desensitization of the 5-HT₃ Receptor in a Rat Glioma x Mouse Neuroblastoma Hybrid Cell". *J Physiol.* **1991**; 436: 293-308.
- Yang J. "Ion Permeation Through 5-Hydroxytryptamine-Gated Channels in Neuroblastoma N18 Cells". *J Gen Physiol.* **1990**; 96: 1177-1198.
- Zhou M, Engel AG, y Auerbach A. "Serum Choline Activates Mutant Acetylcholine Receptors That Cause Slow Channel Congenital Myasthenic Syndromes". *PNAS.* **1999**; 96: 10466-10471.
- Zhou Y, John PE, y Auerbach AL. "{Phi}-Value Analysis of a Linear, Sequential Reaction Mechanism: Theory and Application to Ion Channel Gating". *Biophys. J.* **2005**; biophysj.
- Zhu B.T. "Mechanistic Explanation for the Unique Pharmacologic Properties of Receptor Partial Agonists". *Biomed. Pharmacother.* **2005**; 59: 76-89.
- Zwart R, De FG, Broad LM, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, y Sher E. "5-Hydroxyindole Potentiates Human Alpha 7 Nicotinic Receptor-Mediated Responses and Enhances Acetylcholine-Induced Glutamate Release in Cerebellar Slices". *Neuropharmacology.* **2002**; 43: 374-384.

Abreviaturas

Abreviaturas

θ_2 : constante de gatillado del canal

β_2 : velocidad de apertura del canal

α_2 : velocidad de cierre del canal

α -BTX: α -bungarotoxina

τ_{crit} : tiempo crítico

τ_{rec} : tiempo de recuperación

τ_x : tiempo de duración del estado "x" (abierto, cerrado, *cluster*, *burst*)

τ_{act} : tiempo de activación

$^{\circ}\text{C}$: grados centígrados

μM : micromolar

μs : microsegundos

2-Me-5HT: 2-metil-serotonina

5-HT: serotonina (5-hidroxitriptamina)

5-HT₃R: receptor de serotonina tipo 3

A: agonista

Å: angstrom

AC: alta conductancia (receptor de alta conductancia)

ACh: acetilcolina

AChBP: proteína unidora de acetilcolina

AChR: receptor de acetilcolina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

Ag: agonista

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazolpropiónico

AMPc: adenosina 3'-5' monofosfato cíclica

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

B: estado bloqueado

bg: receptor conteniendo una mutación inicial (*background*)

C: estado cerrado

Ca^{2+} : catión calcio

CB: estado cerrado bloqueado

CD: estado cerrado desensibilizado

C_B: estado cerrado breve
C_I: estado cerrado intermedio
C_L: estado cerrado largo
D: estado desensibilizado
DMEM: *Dulbecco Modified Eagle Medium*
EC: segmento extracelular
EC₅₀: dosis efectiva 50
ECS: solución extracelular
F: estado de pre-activación (*flipped*)
G: energía libre de Gibbs
GABA: ácido γ -aminobutírico
GFP: proteína verde fluorescente
GlyR: receptor de glicina
HEK: células embrionarias de riñón humano
hs: horas
I: corriente
IC: segmento intracelular
ICS: solución intracelular
INC: inhibidor no competitivo
K⁺: catión potasio
kcal: kilocalorías
kHz: kilohertz
LGIC: canales iónicos activados por ligandos
log: logaritmo
M: molar (concentración)
M1: primer segmento transmembranal
M2: segundo segmento transmembranal
M3: tercer segmento transmembranal
M4: cuarto segmento transmembranal
MA: hélice- α del *loop* M3-M4
mM: milimolar
ms: milisegundos
mV: milivoltio
Na⁺: catión sodio
NAM: modulador alostérico negativo

nm: nanometros
NMDA: *N*-metil-D-aspartato
O: estado abierto
OB: estado abierto bloqueado
O_B: estado abierto breve
O_I: estado abierto intermedio
O_L: estado abierto largo
pA: picoampere
PAM: modulador alostérico positivo
P_{apertura}: probabilidad de apertura
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDB: base de datos de proteínas
PLC: fosfolipasa C
pS: picosiemens
R*: estado activo
R: estado de reposo
REFER: *Rate-Equilibrium Free Energy Relationship*
s: segundos
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
SSE: suma del error al cuadrado
TM: segmento transmembranal
TMA: tetrametilamonio
V: voltaje
ZAC: canales activados por cinc

Publicaciones

Publicaciones

1) *"Mechanistic Contributions of Residues in the M1 Transmembrane Domain of the Nicotinic Receptor to Channel Gating"*.

Guillermo Spitzmaul, **Jeremías Corradi**, and Cecilia Bouzat

Molecular Membrane Biology, January - February **2004**, 21, 39-50

2) *"Role of pairwise interactions between M1 and M2 domains of the nicotinic receptor in channel gating"*.

Jeremías Corradi, Guillermo Spitzmaul, María José De Rosa, Marcelo Costabel and Cecilia Bouzat.

Biophysical Journal, **2007** Jan 1;92(1):76-86.

3) *"Subunit-selective role of the M3 transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor in channel gating"*.

De Rosa MJ, **Corradi J**, and Bouzat C.

Biochimica et Biophysica Acta. **2008** Feb; 1778(2):521-9.

4) *"Binding-pore interface of homomeric Cys-loop receptors governs open channel lifetime and rate of desensitization"*.

Cecilia Bouzat, Mariana Bartos, **Jeremías Corradi**, and Steven M. Sine.

Journal of Neuroscience. **2008** Jul 30;28(31):7808-19.

5) *"Single-Channel Kinetic Analysis for Activation and Desensitization of Homomeric 5-HT_{3A} Receptors"*.

Jeremías Corradi, Fernanda Gumilar, and Cecilia Bouzat.

Biophysical Journal, Enviado: 22 de Octubre de **2008**. En revisión.